

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios sobre la transcripción en cromosomas politénicos
de Chironomus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Patricio Aller Tresguerres

DIRECTOR:

José Luis Díez Cortés

Madrid, 2015

T 577. 21
ALL
est



530607411X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

ESTUDIOS SOBRE LA TRANSCRIPCION EN
CROMOSOMAS POLITENICOS DE CHIRONOMUS

Tesis Doctoral presentada por
PATRICIO ALLER TRESGUERRES
Licenciado en Ciencias Biológicas
para optar al grado de Doctor.

Diciembre de 1978



R. 23.094

Vº Bº

El Director de la Tesis

Dr. José Luis Díez Cortes

Los trabajos que han dado lugar a esta Tesis han sido realizados en el Departamento de Citología del Instituto de Biología Celular (C.S.I.C.). Vaya mi más sincero agradecimiento para todos sus miembros, por la colaboración que, de un modo u otro, me han prestado.

De una manera especial deseo agradecer al Dr. José Luis Díez Cortes, director del trabajo, todo el esfuerzo desarrollado para hacer posible su feliz realización.

Por último, expreso también mi reconocimiento al Profesor Dr. Juan Ramón Lacadena, quien se ha brindado amablemente a ser el ponente de esta Tesis.



I N D I C E

	pag.
<u>RESUMEN</u>	I
<u>INTRODUCCION</u>	
1. NATURALEZA Y SIGNIFICADO DE LOS CROMOSOMAS POLITENICOS	
1.1. Generalidades	1
1.2. Estructura del cromosoma politénico	2
1.3. El fenómeno de puffing y su significado	3
1.4. Características de la transcripción en glándulas salivales de Chironomus	5
2. CONTROL DE LA TRANSCRIPCION EN ORGANISMOS EUCARIOTICOS..	8
2.1. Empleo de inhibidores de la síntesis de proteínas..	9
2.2. Interés de las células politenizadas para los es- tudios sobre la expresión génica y su regulación ..	11
<u>TESIS A PLANTEAR</u>	13
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
1. CONDICIONES DE CULTIVO	16
2. CONDICIONES DE TRATAMIENTO	
2.1. Extracción de las glándulas salivales	17
2.2. Tratamiento " in vivo " e " in vitro "	17
2.3. Tratamiento comparado de glándulas hermanas	18
2.4. Medios de incubación " in vitro "	19

3. METODOS CITOLOGICOS

3.1. Preparaciones citológicas	23
3.2. Técnica autorradiográfica	24

4. METODOS BIOQUIMICOS

4.1. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos	
4.1.1. Fijación de las glándulas	24
4.1.2. Digestión enzimática de las glándulas	25
4.1.3. Purificación del extracto	26
4.2. Medida de la concentración en ácidos nucleicos .	28
4.3. Condiciones de marcado radiactivo	
4.3.1. Proteínas	28
4.3.2. RNA	28
4.4. Estimación de la radiactividad ácido-soluble	29
4.5. Estimación de la radiactividad incorporada en ma- cromoléculas	29
4.5.1. Incorporación en proteínas	30
4.5.2. Incorporación en RNA	30
4.6. Medida de la actividad RNA polimerasa	31
4.7. Contaje de la radiactividad	32
4.8. Análisis electroforético	
4.8.1. Solución tampón de electroforesis	32
4.8.2. Preparación de los geles	33
4.8.3. Preparación de la muestra	33
4.8.4. Condiciones de la separación electroforética.	33
4.8.5. Procesamiento de los geles. Perfiles de ab- sorción y radiactividad	34

5. CONDICIONES DE ESTERILIDAD	35
6. MATERIALES	
6.1. Productos químicos	36
6.2. Equipo	38
6.3. Otros	39

RESULTADOS

1. ESTUDIOS PRELIMINARES

1.1. La glándula salival de Chironomus	40
1.2. Extracción y purificación del RNA glandular	
1.2.1 Rendimiento comparado de la extracción utilizando proteínasa K y pronasa	42
1.2.2. Cinética de la extracción con pronasa	44
1.2.3. Caracterización del grado de pureza en ácidos nucleicos	46
1.3. Incorporación de uridina- H^3 en RNA	
1.3.1. Caracterización enzimática de la radiactividad incorporada	51
1.3.2. Cinética de la incorporación " in vitro "	
a.- Incorporación en medio C.R.	52
b.- Incorporación en medio de Cannon	55
1.4. Análisis electroforético del RNA	
1.4.1. Perfil del RNA recién sintetizado	57
1.4.2. Consideraciones metodológicas	
a.- Dependencia del perfil con la concentración de agarosa	61
b.- Fijación y lavado del gel	65

1.4.3. Caracterización enzimática del perfil de radiactividad	67
1.4.4. Perfil del RNA estable	69
1.5. Valoración relativa de la actividad de transcripcón	69
2. INCORPORACION DE URIDINA EN AUSENCIA DE SINTESIS DE PROTEINAS	
2.1. Efecto " in vivo " de la cicloheximida sobre la incorporación de lisina-H ³ y uridina-H ³	74
2.2. Efecto " in vitro " de la cicloheximida y anisomicina sobre la incorporación de lisina-H ³	77
2.3. Efecto " in vitro " de la cicloheximida y anisomicina sobre la incorporación de uridina-H ³ ...	79
2.4. Efecto " in vitro " de la cicloheximida sobre la estabilidad del RNA recién sintetizado	84
3. ESTUDIO SOBRE PERMEABILIDAD CELULAR A LA URIDINA ..	89
3.1. Medida de la tasa de captación de uridina	90
3.2. Medida de la captación e incorporación " in vitro " de uridina, en función de su concentración externa	94
3.3. Efecto " in vitro " de diversos inhibidores sobre la tasa de captación e incorporación de uridina	99
3.4. Efecto del choque térmico sobre la tasa de captación e incorporación de uridina. Relación con el estado de puffing.	

3.5. Efecto de la cicloheximida y anisomicina sobre la tasa de captación de uridina	113
3.6. Determinación de la radiactividad incorporada " corregida "	120
4. EFECTO " IN VITRO " DE LA CICLOHEXIMIDA Y ANISOMI- CINA SOBRE LA SISTESIS DE RNA	
4.1. Modificación de la radiactividad incorporada " corregida "	125
4.2. Efecto de la cicloheximida y anisomicina so- bre las distintas especies de RNA	
4.2.1. Medición de la radiactividad ácido-soluble bajo condiciones de fijación con etanol...	134
4.2.2. Análisis electroforético	137
5. EFECTO " IN VIVO " DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA SIN- TESIS DE RNA	
5.1. Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de RNA total, y en sus diferentes especies	147
5.2. Análisis autorradiográfico de la incorporación de uridina-H ³	155
6. EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA	160
<u>DISCUSION</u>	165
1. ASPECTOS METODOLOGICOS	
1.1. Sobre los estudios preliminares	166
1.2. Sobre la actividad de captación de uridina ...	168

2. RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE TRANSCRIPCION A LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS	
2.1. Sobre el incremento de la síntesis de RNA 171
2.2. Sobre el carácter selectivo de la inhibición	... 175
2.2.1. RNA nucleoplásmico 176
2.2.2. RNA nucleolar 178
2.3. En torno a un modelo de regulación de la transcripción 185
2.3.1. Restricción y relajación. Modelo de Gross y Pogo 185
2.3.2. Posibles mecanismos de control de la expresión génica en células politenizadas	.. 189
2.3.3. Sobre la activación de la síntesis de RNA nucleolar 193
<u>CONCLUSIONES</u> 195
<u>BIBLIOGRAFIA</u> 197

RESUMEN

Los resultados que han dado lugar a esta Tesis pueden agruparse en dos grandes apartados: uno de carácter metodológico, consistente en la puesta a punto de las técnicas bioquímicas aptas para el análisis de la actividad de transcripción en glándulas salivales de *Chironomus*; otro de carácter temático, donde se estudia la respuesta de la actividad de transcripción a la inhibición de síntesis de proteínas.

1.- En primer lugar se han caracterizado las condiciones de marcado radiactivo del RNA, especialmente bajo incubación "in vitro" de las glándulas aisladas, así como las condiciones de extracción enzimática y posterior purificación del extracto que proporcionan una solución de elevada pureza en ácidos nucleicos. Se ha elaborado también un método de análisis electroforético del RNA glandular, mediante geles de agarosa en columna, caracterizándose de este modo los perfiles de RNA recién sintetizado y estable en *Chironomus pallidivittatus* y *Chironomus thummi*.

De especial interés, por su total novedad en este sistema biológico, ha sido la puesta a punto de un método que nos permite estimar la tasa de captación ("uptake-") de uridina- H^3 , medida como radiactividad ácido-soluble, en glándulas salivales. Su uso nos ha permitido:

+) Observar que la tasa de captación de uridina es diferencialmente modificada por aplicación "in vitro" de diversos inhibidores.

+) Comprobar que la discrepancia observada entre el tamaño e intensidad de marcado autorradiográfico en algún puff particular, como consecuencia de un choque térmico, es explicable por los cambios inducidos en la tasa de captación de uridina por efecto del tratamiento.

Estas observaciones nos han llevado, para una estimación relativa de la actividad de transcripción, a la necesidad de elaborar factores de corrección que eliminen el influjo de posibles

cambios en la tasa de captación del nucleósido precursor. Su aplicación puede modificar cuantitativa o, incluso, cualitativamente, las conclusiones inicialmente alcanzadas de la sólo consideración de la radiactividad incorporada en RNA.

2.- En el aspecto temático, se ha observado que la aplicación de clicloheximida o anisomicina, a dosis fuertemente inhibitorias de la síntesis de proteínas, inducen un incremento de la radiactividad incorporada en RNA. Dicho incremento no es explicable ni por una modificación en la estabilidad del RNA recién sintetizado ni, al menos totalmente, por el aumento producido en la tasa de captación de uridina- H^3 . Ello parece indicar que en tales condiciones se induce una activación de la síntesis de RNA.

La medida de la actividad RNA polimerasa en células fijadas ha confirmado, de un modo directo, la existencia de dicho aumento de la actividad de transcripción, y que éste es debido, al menos en parte, a una mayor actividad de " iniciación ".

Por último, el análisis electroforético ha demostrado que la respuesta a la inhibición de la síntesis de proteínas es diferente para las distintas especies de RNA recién sintetizado:

- +) Se produce un incremento máximo para el RNA de pequeño tamaño (4-5S).
- +) En menor medida, dicho incremento afecta también al hnRNA de grande y mediano peso molecular.
- +) La respuesta del RNA de origen nucleolar (pre-rRNA) es distinta según los inhibidores sean aplicados " in vitro " (produciéndose activación) o " in vivo " (produciéndose entonces una inhibición selectiva de esta especie de RNA).

Estos datos, y otras evidencias morfológicas aducidas, sugieren la existencia de distintos mecanismos de regulación de la transcripción en células politenizadas, con alta especificidad local de acción. Estos mecanismos son discutidos a la luz del fenómeno de " control estricto ", y su observación en organismos eucarióticos.

INTRODUCCION

1. NATURALEZA Y SIGNIFICADO DE LOS CROMOSOMAS POLITÉNICOS.

1.1. Generalidades.

El descubrimiento de los cromosomas politénicos se debe a Balbiani, quien, en 1881, detectó la presencia de unos corpúsculos nucleares, de naturaleza desconocida, en células de glándulas salivales de *Chironomus*. Sin embargo, su naturaleza cromosómica no fue reconocida hasta cincuenta años más tarde, gracias a los trabajos de Heitz y Bauer (1933), y Painter (1933). Desde entonces hasta nuestros días han sido muy abundantes las investigaciones llevadas a cabo usando como material este tipo peculiar de cromosomas.

La célula politenizada se origina a partir de la célula diploide, mediante sucesivos ciclos de replicación de cada cromatidio, sin que tengan lugar paralelamente otros procesos característicos del ciclo celular: p.e., la disgregación de la membrana nuclear, o la división en células hijas. En la mayoría de los casos ésto da como resultado final una célula poliploide (fenómeno de " endopoliploidía "). Pero en otras ocasiones los cromatidios, al término de cada ciclo replicativo, no se segregan: pueden entonces permanecer como un conjunto de fibras o manojos de fibras lãxamente unidas - p.e., en células nutricias del ovario de *Calliphora erythrocephala* (Beermann, 1962) - o bien, y es lo más frecuente, quedar como un haz muy compacto de filamentos íntimamente apareados. El resultado final es, en este caso, la formación de estruc-

turas cromosómicas gigantes, interfásicas, conocidas como " cromosomas politénicos ".

Endopoliploidía y politenia son, pues, fenómenos estrechamente relacionados por un origen común, que incluso, en ocasiones, pueden coexistir simultáneamente (p.e., en *Cnidarios*).

Aunque estudiado fundamentalmente en Dípteros, la existencia de células politenizadas está ampliamente extendida en la Naturaleza: p.e., en otro orden de insectos, Colémbolos (Prabhoo, 1961; Cassagneau, 1971); en protozoos (p.e., Alonso y Pérez-Silva, 1961; Ammermann, 1965), y en plantas superiores (p.e., Nagl, 1969 a,b). Su significado biológico radica en ser un eficiente mecanismo de multiplicación del material genético en orden a la producción en gran cantidad de ciertos metabolitos precisos para el desarrollo del organismo . De este modo, la acumulación de muchas copias de material genético en unas pocas células, acompañado de un extraordinario crecimiento de las mismas, se presenta como una alternativa a su mayor proliferación numérica.

1.2. Estructura del cromosoma politénico.

Considerado transversalmente, la estructura del cromosoma politénico responde al apareamiento estrecho de muchas copias del mismo cromatidio. Por lo general, además, los homólogos permanecen íntimamente unidos, con lo que el núcleo aparece como dotado de un número haploide. En cuanto al grado de politenia, depende del número de ciclos de replicación,

lo cual es propio de cada especie y, dentro de ella, del tejido considerado. En el caso de los Dípteros, la politenización máxima ocurre generalmente en las glándulas salivales: en *Chironomus* se ha estimado en 12 - 13 ciclos (Daneholt y Edström, 1967).

Examinado longitudinalmente, el cromosoma aparece estructurado como una sucesión de bandas e interbandas, con una disposición regular y constante para cada especie. El concepto de banda e interbanda, a nivel del cromosoma completo, muestra una clara relación con el concepto de cromómero e intercromómero, a nivel del simple cromatidio. Si el cromómero es el resultado de un grado máximo de espiralización de la fibra y, por tanto, de concentración de DNA y proteínas asociadas, la banda es la consecuencia del apareamiento exacto de los cientos o miles de cromómeros hermanos y homólogos resultantes del proceso de politenización. De ahí que, aproximadamente, el 95% del DNA cromosómico está localizado en las bandas, y sólo el 5% restante en las interbandas (Swift, 1962; Beermann, 1972). Lo mismo que el cromómero, la banda es entonces una unidad de replicación (Keyl y Pelling, 1963; Plaut, 1963) y de transcripción (Pelling, 1964; Beermann, 1972).

1.3. El fenómeno de puffing y su significado.

Esta estructura regular del cromosoma politénico se ve alterada por la aparición de expansiones laterales en ciertas

regiones, conocidas como " puffs ". El puff puede definirse como una modificación local en la disposición estructural del DNA y proteínas asociadas, lo cual supone la desespiralización de las fibras y la acumulación de ribonucleoproteínas en tal lugar. Por lo general el puff está restringido a una sola banda (implicando probablemente también las interbandas adyacentes: Beermann, 1962 y 1967), aunque en ocasiones puede ser originado por varias bandas vecinas (p.e., los anillos de Balbiani 1 y 2 en *Ch. tentans*: Beermann, 1962; Lambert, 1975). En todo caso, el número de cromómeros que participan activamente en el puff - es decir, que están actualmente desespiralizados - puede variar. Como discutiremos más adelante, esa mayor o menor participación constituye probablemente un modo peculiar de regulación local de la expresión génica en las células politenizadas.

Respecto a su significado funcional, se admite que el fenómeno de puffing indica cambios y, más exactamente, crecimiento en la actividad génica de los loci implicados (Beermann, 1956). En efecto, mediante análisis autorradiográficos parece probarse que, si bien existe incorporación a lo largo de todo el cromosoma, ésta es considerablemente más intensa en las regiones desespiralizadas (Berendes, 1973), y que parece darse una relación directa entre el tamaño del puff y la actividad local de transcripción (Pelling, 1964).

Por lo general, los puffs son estructuras transitorias y

y de pequeñas dimensiones, ligadas en su aparición a periodos concretos del desarrollo y a determinadas condiciones ambientales. (Como revisión sobre el fenómeno de puffing y su regulación puede verse Ashburner, 1970 y 1972 a,b; Berendes, 1972; Bostock y Sumner, 1978). Sin embargo se ha detectado en algunas especies la presencia de puffs gigantes que muestran una actividad especialmente intensa de síntesis y acumulación de RNA (Pelling, 1964; Daneholt et al., 1969 a,b). Tal es el caso del genoma de *Chironomus*, donde se originan y permanecen desde los comienzos de la politenización. A estas estructuras , por lo general de carácter permanente, se les conoce como " anillos de Balbiani " (BRs), para diferenciarlos de los pequeños puffs transitorios.

El valor de estos anillos de Balbiani estriba en que constituyen un sistema extraordinariamente favorable para el abordaje del problema de la expresión génica y su regulación en organismos eucarióticos, por cuanto permiten una fácil caracterización morfológica y un análisis directo de los productos de transcripción del locus o loci implicados.

1.4. Características de la transcripción en glándulas salivales de *Chironomus*.

Dada la finalidad de este trabajo, se hace necesaria una referencia especial a las propiedades y distribución del RNA recién sintetizado - i.e., el RNA rápidamente marcado en un corto pulso - en glándulas salivales de *Chironomus*. Las es-

pecies de RNA pueden ser agrupadas en tres grandes familias: RNA heterogéneo, RNA nucleolar, y RNA de bajo peso molecular.

a.- RNA heterogéneo (hnRNA).

Se incluye bajo esta categoría una gran variedad de especies de RNA recién sintetizado, que forman una distribución continua en los perfiles obtenidos mediante diversas técnicas de fraccionamiento. Como en otros géneros de Dípteros, en *Chironomus* tiene una especial relevancia la fracción de hnRNA de alto peso molecular, con una distribución 15S - 100S (p.e., en *Ch. tentans*: Edström y Daneholt, 1967; Daneholt, 1972; en *Ch. thummi*: Serfling et al., 1972). Aunque la mayor parte de este RNA es de muy corta vida, siendo rápidamente degradado en el núcleo, su importancia radica en la presencia de algunos transcriptos gigantes, dotados de características peculiares. A saber:

+) Sintetizados a nivel de los grandes anillos de Balbiani, son procesados y exportados al citoplasma sin apenas degradación parcial.

+) Mantienen, ya en el citoplasma, una vida media muy larga.

+) Se estima que su papel estriba en ser los mensajeros de las proteínas específicas de secreción sintetizadas por las células politenizadas.

Un ejemplo de estos mensajeros específicos lo constituye

el transcripto 75S, del que se ha obtenido un grado de caracterización casi único en el campo de la biología molecular de células eucarióticas. La conjunción de técnicas citológicas y bioquímicas ha permitido aislar e identificar los genes responsables de su síntesis, conocer su procesamiento y seguir su exportación al citoplasma, y finalmente aislarlo en forma polisomal.

Para una información más completa sobre este tema puede verse Daneholt (1974 y 1975), y Case y Daneholt (1978).

b.- RNA de origen nucleolar (pre-rRNA).

El transcripto inicial ribosomal, pre-rRNA 38S, es sintetizado en la región del organizador nucleolar, según ha sido demostrado en *Chironomus* por técnicas de hibridación in situ (Lambert et al., 1972). Es procesado en el propio nucleolo a las formas preribosomales intermedias 30S y 23S, que a su vez darán lugar a las especies ribosomales estables 28S y 18S (Edstrom y Daneholt, 1967; Ringborg et al., 1970; Ringborg y Rydlander, 1971; Serfling et al., 1974).

c.- RNA de bajo peso molecular.

La fracción predominante de esta categoría está constituida por el RNA de transferencia (Egyhazi et al., 1969). Técnicas de hibridación in situ han permitido demostrar que los loci responsables de su síntesis se hallan dispersos por todo el genoma (Edström et al., 1971). Sintetizado como un pre-tRNA 4-5S, es rápidamente procesado, probablemente en el

interior del núcleo, a la forma estable 4S.

En menor proporción se incluye también aquí el pequeño componente ribosomal 5S. Como en otros Dípteros, su síntesis se localiza fuera de los genes nucleolares, sin aparente relación con las otras especies ribosomales (Wieslander et al., 1975).

Por último, se incluyen también aquí otras pequeñas especies, como los RNAs 7S y 8S (Egyházi et al., 1971), de función desconocida.

2. CONTROL DE LA TRANSCRIPCION EN ORGANISMOS EUCARIOTICOS.

Dentro del conjunto de los procesos implicados en la expresión génica, la transcripción puede considerarse su nivel primario. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos de regulación de la transcripción constituye una de las piezas clave para la comprensión, a nivel molecular, de los procesos de desarrollo y diferenciación celular, por los cuales, a partir de una célula inicial indiferenciada, se desemboca en un organismo completo como conjunto bien estructurado en órganos, tejidos y células morfológica y funcionalmente especializados.

El mecanismo de transcripción y su regulación ha sido fundamentalmente caracterizado en procariotes. Por el contrario, son escasos los resultados obtenidos hasta el momento en células eucarióticas, donde la aproximación experimental se ve sensiblemente dificultada por la mayor complejidad del

sistema biológico y, en particular, de la estructura del genoma. De ahí que se haya recurrido frecuentemente a:

+) Extrapolar las conclusiones alcanzadas en organismos eucarióticos.

+) Establecer modelos de regulación muy teóricos y apriorísticos, pero carentes de una suficiente base experimental.

2.1. Empleo de inhibidores de la síntesis de proteínas.

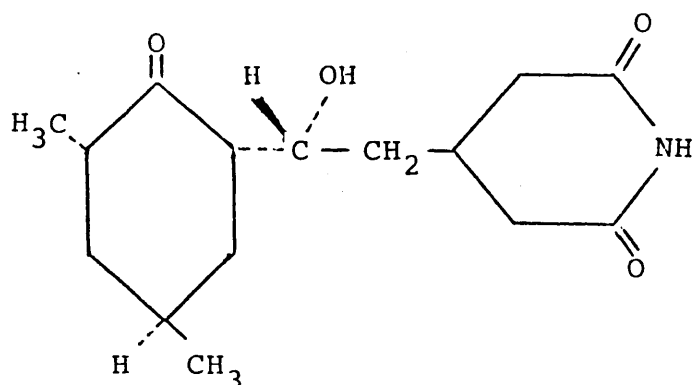
No obstante, se está efectuando en los últimos años un serio esfuerzo experimental para abordar directamente estos problemas en células eucarióticas. Uno de los modos de aproximación a este problema es el estudio de la dependencia del mecanismo de transcripción con el aporte proteico: es decir, analizar las modificaciones en la actividad de síntesis de RNA bajo condiciones de inhibición de la síntesis de proteínas. Para lograrlo se utilizan:

+) Tratamientos físicos: p.e., dieta deficiente en algún componente esencial; modificación de la temperatura en líneas celulares termosensibles, etc.

+) Tratamientos químicos: por aplicación de inhibidores específicos de la síntesis de proteínas.

Han sido muchos los inhibidores empleados con esta finalidad. Aquí nos referiremos solamente a la cicloheximida (CHM) y anisomicina (ANS), que serán los dos utilizados a lo largo del presente trabajo.

a.- La cicloheximida (actidione) es un inhibidor ampliamente utilizado para estudios teóricos. Aislado por Whiffen et al. (1946) a partir de *Streptomyces griseus*, está dotado de peso molecular 281,34, siendo su fórmula:

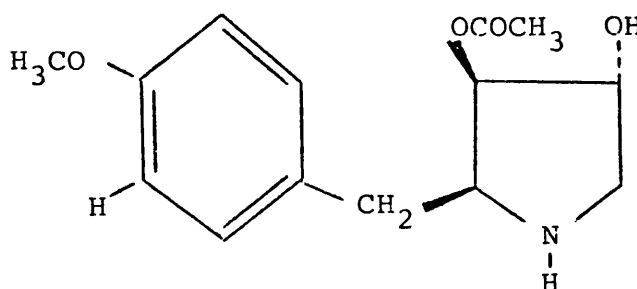


La CHM es enormemente tóxica en todos los organismos eucarióticos donde ha sido ensayada, inhibiendo violentamente la síntesis de proteínas, pero no parece tener efecto alguno en bacterias. La molécula actúa uniéndose a los ribosomas (subunidad 60S), impidiendo la translocación del peptidil tRNA durante la fase de " elongación " de la cadena peptídica en formación. Algunos resultados parecen indicar también posibles interferencias con otras fases del mecanismo de traducción.

Por lo demás, la CHM produce otras alteraciones metabólicas: p.e., acumulación de ciertos metabolitos, en particular nucleótidos (Siegel y Sisler, 1964), inhibición parcial de la síntesis de DNA (Kerridge, 1958; Bennet et al., 1964; Venkatesan, 1977), y, en particular, la inhibición preferencial de la actividad RNA polimerasa nucleolar (Fiala y Davis, 1965; Muramatsu et al., 1970; Onishi et al., 1977). Se

admite comunmente que estos efectos no son directos, sino mediados por la inhibición de la síntesis de proteínas.

b.- La anisomicina, por el contrario, ha sido escasamente utilizada en estudios teóricos. Aislada a partir de varias especies de *Streptomyces* (Sobin y Tanner, 1954), presenta un peso molecular de 265,3, siendo su fórmula:



La ANS inhibe específicamente la síntesis de proteínas en células eucarióticas, sin afectar aparentemente a bacterias. Su sitio de acción son los ribosomas, uniéndose de manera muy reversible a la subunidad 60S, donde actúa impidiendo la formación del enlace peptídico, a nivel de la fase de " elongación ". Por lo demás presenta otros efectos sobre la síntesis de DNA (inhibición parcial) y de RNA (Grollman , 1967).

Una información más completa sobre estos y otros inhibidores, y su mecanismo de acción, puede verse en las revisiones de Jiménez (1974) y Vázquez (1975).

2.2. Interés de las células politenizadas para los estudios sobre la expresión génica y su regulación.

En el contexto de esta problemática, la glándula salival

de *Chironomus* constituye un sistema biológico de características idóneas para el abordaje de las cuestiones relacionadas con el control de la expresión génica. En efecto:

a.- En primer lugar, presenta una elevada especialización funcional. Sus células politenizadas están altamente diferenciadas en orden a la producción de unas pocas proteínas de secreción. Sintetizados a partir de los grandes mRNAs específicos, estas proteínas, en número no superior a doce, suponen al menos el 80% del total de la actividad de traducción (Doyle y Laufer, 1969; Wobus et al., 1970).

b.- En segundo lugar, los cromosomas politénicos son cromosomas interfásicos - y, por ello, génicamente activos - dotados de características morfológicas que permiten compatibilizar los resultados obtenidos por métodos bioquímicos con determinaciones citológicas complementarias. Así:

+) Su gran tamaño hace fácilmente aplicables técnicas autorradiográficas y de hibridación in situ.

+) El control del modelo de puffing y sus modificaciones, como expresión morfológica de cambios en la actividad génica, permite establecer relaciones estructura - función.

c.- Por último, la aplicación de técnicas de microdissección posibilita el aislar zonas muy definidas del genoma, incluso a nivel de genes individuales, y caracterizar sus productos de transcripción.

TESIS A PLANTEAR.

Como se indicó previamente, los inhibidores específicos de la síntesis de proteínas constituyen una herramienta eficaz para la aproximación al conocimiento de las relaciones transcripción - traducción, y de los mecanismos implicados en la regulación de la síntesis de RNA, por cuanto permiten observar la respuesta del sistema de transcripción a un cese en el aporte de nuevas proteínas. Entre dichos inhibidores, la cicloheximida es sin duda alguna el más empleado en células eucarióticas, habiéndose desarrollado, en los últimos quince años, una amplísima bibliografía sobre su aplicación en diversos sistemas biológicos: protozoos (Rudick y Weisman, 1973; Eckert et al., 1975), levaduras (Siegel y Sissler, 1964; De Kloet, 1965; Fukuhara, 1965; Foury y Goffeau, 1973; Gross y Pogo, 1974, 1976 a,b), hongos (Fiala y Davis, 1965; Horgen y Griffin, 1971), plantas superiores (Key, 1966; Ross, 1968; Delseny et al., 1977), y en células de mamíferos (p.e., células HeLa: Summers et al., 1966; Willems et al., 1969; Smulson y Thomas, 1969; células de tumor ascítico: Franze-Fernández y Fontanive-Sangüesa, 1973; Cereghini y Franze-Fernández, 1974; Grummt et al., 1976; células hepáticas: Higashi et al., 1968; Rizzo y Webb, 1969; Muramatsu et al., 1970).

En células politenizadas, la CHM y otros inhibidores han sido utilizados primordialmente en estudios citológicos, con

el fin de examinar el efecto de la síntesis de proteínas sobre el estado de puffing (Villanueva, 1978; Santa-Cruz, en preparación), sobre la inducción de nuevos puffs (Clever, 1967; Serfling et al., 1969; Schoon y Rensing, 1973), o sobre la formación de " droplets " (Díez y Stockert, 1976). Por el contrario, son muy escasas las determinaciones de carácter bioquímico en este sistema biológico. Con tal motivo, esta Tesis busca iniciar, en cierta medida, una complementación a nivel bioquímico de los conocimientos citológicos ya alcanzados.

Los cinco aspectos fundamentales del trabajo a realizar serán:

- 1.- Poner a punto las técnicas fundamentales que nos permitan estimar la actividad de transcripción: extracción, purificación, medida y caracterización de la síntesis de RNA.

- 2.- La actividad de transcripción es medida como incorporación en RNA de un precursor marcado, por lo que es preciso controlar toda posible alteración previa en la tasa de captación (" uptake ") por las células de dicho precursor. Dado que este parámetro nunca había sido abordado experimentalmente en células politenizadas, intentaremos elaborar un método apto para medir la tasa de captación de uridina en glándulas salivales, y estudiaremos las modificaciones inducidas en dicha tasa por diversos tratamientos físicos y químicos.

3.- Se examinará el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas, por aplicación " in vivo" e " in vitro " de CHM y ANS, sobre la síntesis de RNA total glandular.

4.- Con el fin de observar si la acción de dichas drogas presenta o no un carácter selectivo, su efecto será examinado en las distintas especies de RNA recién sintetizado, y se intentará corroborar las conclusiones alcanzadas mediante análisis autorradiográfico.

5.- Por último, al menos en algún caso, se buscará la confirmación de los fenómenos observados mediante estimación directa de la actividad RNA polimerasa.

0741 X

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. CONDICIONES DE CULTIVO.

Se usó como material biológico glándulas salivales de larvas de *Chironomus pallidivittatus* y *Chironomus thummi*. Las larvas de *Ch. pallidivittatus* provenían de Tübingen (República Federal de Alemania), y las de *Ch. thummi* fueron recogidas en Masamagrell (Valencia). En todo caso, las larvas usadas en los experimentos estaban adaptadas a las condiciones artificiales de mantenimiento en el laboratorio por desarrollo durante varias generaciones.

En este trabajo se utilizaron sólo larvas en el cuarto estadio larvario, anteriores al período prepupal.

El cultivo de las larvas se efectuó esencialmente de acuerdo a lo descrito por Beermann (1952). Las puestas eran recogidas e implantadas individualmente en cubetas de plástico conteniendo aproximadamente 0,5 litros de medio artificial de cultivo, de composición:

<u>Componente</u>	<u>por 10 l de H₂O dest.</u>
ClNa	0,35 g
SO ₄ Mg	0,61 g
Cl ₂ Ca	0,36 g
CO ₃ HNa	0,05 g
PO ₄ HK	0,02 g
Cl ₃ Fe (solución al 1%)	1 ml.

Al medio de cultivo se le adicionaban algunas láminas de celulosa. El desarrollo de las larvas tenía lugar en una cá-

mara de cultivo , bajo condiciones constantes de 18°C de temperatura y un período de 18 h de luz - 6 h de oscuridad. La alimentación se realizaba dos veces por semana con polvo de ortiga , y el agua de cultivo era renovada aproximadamente cada 15 días.

El apareamiento de los adultos se efectuaba de distinto modo, según especies. En el caso de *Ch. thummi*, tenía lugar libremente, en su propia cubeta de cultivo, recubierta de una gasa fina. En el caso de *Ch. thummi*, se establecían parejas individualmente en tubos de vidrio conteniendo un pequeño volumen del agua de cultivo.

2. CONDICIONES DE TRATAMIENTO.

2.1. Extracción de las glándulas salivales.

Las larvas eran previamente lavadas en un volumen amplio de agua de cultivo estéril, a fin de eliminar en lo posible todo contaminante externo, siendo entonces decapitadas bajo la lupa. Las glándulas eran extraídas fácilmente aplicando una ligera presión con ayuda de una aguja enmangada.

2.2. Tratamiento " in vivo " e " in vitro ".

La terminología aquí utilizada no se corresponde con el significado usual en la literatura , donde " in vivo " e " in vitro " hacen referencia, respectivamente, a los ensayos realizados con células vivas completas, o con fracciones o extractos celulares. En nuestro caso entendemos por tratamien-

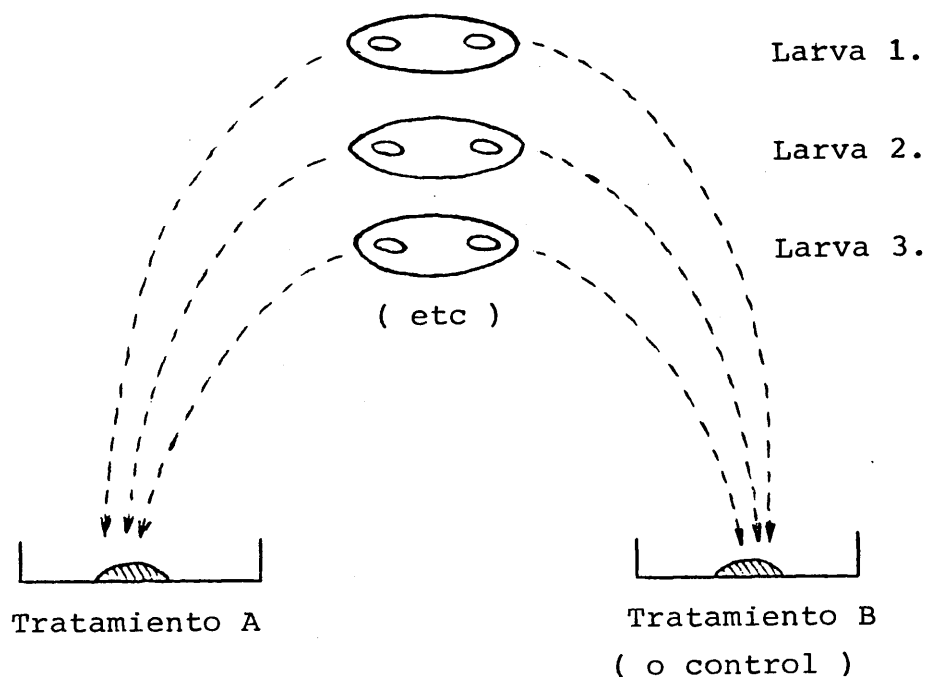
to " in vivo" al aplicado sobre la larva completa, en tanto tratamiento " in vitro " es el que se aplica directamente sobre las glándulas salivales previamente explantadas. Por lo demás, esta terminología es la usual en los estudios realizados con glándulas salivales de Dípteros.

Para aplicar el tratamiento " in vivo ", las larvas eran mantenidas en un cristalizador conteniendo un volumen adecuado de su propio medio de cultivo, previamente filtrado. La proporción usualmente empleada era de 4 - 8 larvas por 50 ml del medio.

Para aplicar un tratamiento " in vitro ", las glándulas extraídas eran transportadas individualmente, con ayuda de una fina aguja de vidrio, a un pocillo de fijación conteniendo un volumen adecuado del medio de incubación (véase 2.4.). Conforme a Lambert y Daneholt (1975), la proporción era de 2 - 4 glándulas por 25 μ l del medio.

2.3. Tratamiento comparado de glándulas hermanas.

Cuando la técnica " in vitro " tenía que ser aplicada para comparar entre sí el efecto de dos tratamientos, o de un tratamiento respecto a su control (no tratado), se recurrió habitualmente a la incubación en paralelo de grupos de glándulas hermanas. Para ello, cada glándula del par de la misma larva era transferida a un pocillo distinto, conteniendo el mismo medio de incubación, conforme se muestra en el esquema 1.



Esquema 1.

De este modo, al comparar resultados obtenidos con glándulas hermanas, se evitan los efectos de variabilidad consecuentes a la utilización de larvas distintas.

2.4. Medios de incubación " in vitro ".

Se emplearon dos medios de incubación distintos para los tratamientos " in vitro ": Chironomus ringer (C.R.) y medio de Cannon.

El medio C.R. (Robert, 1971) es una solución salina apropiada para períodos breves de incubación. Su composición es:

ClNa 0,51 g
 ClK 23,86 mg
 Cl₂Ca 14,43 mg
 en 100 ml de tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7,3.

El medio de Cannon, según modificación de Ringborg y Rydlander (1971), es un complejo fisiológico más apto para incubaciones prolongadas. Su composición es:

a.- Sales inorgánicas:

PO₄HNa₂.2H₂O 356 mg
 Cl₂Mg.6H₂O 93,5 mg
 ClK 82 mg
 ClNa 420 mg
 SO₄Na₂.10H₂O 2.000 mg
 Cl₂Ca. 2H₂O 56 mg

b.- Azúcares:

Glucosa 140 mg
 Fructosa 80 mg
 Sacarosa 80 mg
 Trehalosa 1.000 mg

c.- Acidos orgánicos.

Málico 134 mg
 α-Cetoglutarico 74 mg
 Succínico 12 mg
 Fumárico 11 mg

d.- Aminoácidos.

L - Arginina mono ClH	140	mg
DL - Lisina mono ClH	250	mg
L - Histidina	500	mg
L - Acido aspártico	70	mg
L - Asparagina	70	mg
L - Acido glutámico	120	mg
L - Glutamina	120	mg
Glicina	130	mg
DL - Serina	220	mg
L - Alanina	45	mg
L - Prolina	70	mg
L - Tirosina	10	mg
DL - Treonina	70	mg
DL - Metionina	180	mg
L - Fenilalanina	30	mg
DL - Valina	40	mg
DL - Isoleucina	20	mg
DL - Leucina	30	mg
L - Triptófano	20	mg
L - Cistina	5	mg
L - Cisteina mono ClH	16	mg

e.- Complejo vitamínico B.

Tiamina - mono ClH	0,004 mg
Riboflavina	0,004 mg
Acido nicotínico	0,004 mg
Acido pantoténico (sal cálcica)		0,004 mg
Biotina	0,004 mg
Acido fólico	0,004 mg
Inositol	0,004 mg
Colina	0.004 mg

f.- Otros componentes.

Colesterol	6	mg
Penicilina (sal potásica)	12	mg
Rojo fenol	20	mg
Estreptomicina (sulfato)	30	mg

Los solutos se disuelven en agua bidestilada. Las sales inorgánicas, salvo el Cl_2Ca , se disuelven en 60 ml. El Cl_2Ca en 15 ml. Los azúcares y ácidos orgánicos, en 30 ml. Los aminoácidos (excepto la L - Glutamina), en 75 ml. Colesterol, penicilina, estreptomicina y rojo fenol, en 5 ml. Las vitaminas se preparan disolviendo 1 mg de cada componente en 1.000 ml, de los cuales se tomarán 4 ml. Las soluciones son entonces mezcladas, siendo el Cl_2Ca lo último que se añade. El pH se ajusta a 7,2 , por adición de NaOH 1N. Finalmente, con agua bides-tilada se completa hasta un volumen final de 300 ml.

La solución es filtrada a través de filtros Millipore, de tamaño de filtro $0,45 \mu\text{m}$, dividida en porciones de 2,5 ml, y conservadas en congelación.

Para su uso, una porción es rápidamente descongelada, añadiéndosele la L - Glutamina (1 mg/ 2,5 ml). El sobrante se desecha.

3. METODOS CITOLOGICOS.

3.1. Preparaciones citológicas.

Las glándulas eran fijadas durante 1 - 2 min en etanol-acético (3:1), y teñidas durante 30 - 60 min con una mezcla de carmín - orceína (2:1), tras lo cual eran montadas sobre el portaobjetos en una gota de ácido acético al 50%, o bien de acético - láctico (1:1). Previamente a la colocación del cubreobjetos la secreción glandular era retirada, pues en caso contrario impediría un buen aplastamiento. Tras colocar el cubreobjetos se golpeaba suavemente con una aguja anmangada, para romper los núcleos y dispersar los cromosomas. El proceso se completaba aplastando el material mediante una suave presión dactilar.

Para obtener preparaciones permanentes se empleaba una tinción más prolongada (90 - 120 min). Las preparaciones eran efectuadas conforme se ha descrito arriba, y el material era inmediatamente congelado manteniendo las preparaciones en nieve carbónica durante 7 - 10 min. Tras levantar el cubreobjetos,

el material era deshidratado sumergiendo la preparación en alcohol isopropílico durante 3 min. El montaje definitivo se llevaba a cabo en una gota de euparal, colocando sobre esta el cubreobjetos.

3.2. Técnica autorradiográfica.

Las glándulas eran marcadas " in vitro " durante 10 min en presencia de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 , deteniéndose la incorporación del precursor por fijación en etanol -acético (3:1). La tinción, montaje, congelación y deshidratación del material se llevaba a cabo del mismo modo que para las preparaciones permanentes (véase 3.1.), utilizando en este caso portaobjetos gelatinados, y suprimiendo el montaje definitivo en euparal. En su lugar, el material era sometido a una postfijación, manteniendo las preparaciones en una mezcla de formalina - etanol (7:3), durante 24 h, en frío.

Al cabo de ese tiempo era colocado el film, siendo expuestas las preparaciones en la oscuridad durante una semana a 4°C, tras lo cual se efectuaba el revelado.

4. MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

4.1. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

4.1.1. Fijación de las glándulas.

Tras ser extraídas (y, por lo general, tras un tratamiento " in vitro "), las glándulas eran fijadas en el mismo pocillo de fijación, bien sea con etanol absoluto frío du-

rante 2 - 4 min, o bien con TCA al 10% en frío durante 10 min. El primer método fue el preferido cuando el RNA tenía que ser analizado electroforéticamente, pues permite condiciones más suaves de digestión (ver punto siguiente) con menor riesgo de degradación parcial del RNA. El segundo método fue el empleado habitualmente cuando se desaba medir la radiactividad soluble intracelular.

4.1.2. Digestión enzimática de las glándulas.

En nuestras condiciones de experimentación los ácidos nucleicos eran extraídos mediante digestión enzimática de las glándulas salivales, siendo transferidas a un vial conteniendo un volumen adecuado del medio de digestión. Con tal fin se han empleado dos enzimas proteolíticas: proteinasa K y pronasa.

a.- Extracción mediante proteinasa K.

La composición del medio de digestión fue la descrita por Gross-Bellard (1973):

125 µg/ml de proteinasa K

EDTA 10 mM

ClNa 10 mM

0,5% de SDS

en solución tampón Tris-ClH 10mM, pH 8.

La digestión se llevó a cabo durante 24 h a 37°C.

b.- Extracción mediante pronasa.

La composición del medio de digestión fue la descrita por

Daneholt y Hosick (1973):

1 mg/ml de pronasa

0,5% de SDS

en solución tampón Tris-ClH 20 mM, pH 7,4.

Las condiciones de digestión dependían del método de fijación previamente aplicado: tras fijación con etanol, 15 min de digestión a temperatura ambiente; tras fijación con TCA era preciso aplicar unas condiciones más enérgicas (habitualmente, 1 h a 37°C).

4.1.3. Purificación del extracto.

a.- Purificación simple.

Una desproteínación simple del extracto fue llevada a cabo por precipitación alcohólica. El digesto era transferido a un tubo de centrifuga, y los ácidos nucleicos precipitados con 2 volúmenes de etanol absoluto, 0,3 M de ClNa, a -20°C durante toda la noche. Habitualmente se adicionaba además 25 - 50 µg de RNA exógeno (procedente de ribosomas de levadura) para favorecer la precipitación. El precipitado era recogido por centrifugación durante 10 min a 12.100 g , secado parcialmente mediante corriente de nitrógeno, y redissuelto en un volumen adecuado de solución tampón de electroforesis (véase su composición más adelante, en 4.8.1.).

b.- Purificación exhaustiva.

Alternativamente, una purificación más rigurosa del extracto fue llevada a cabo, de acuerdo básicamente al método

descrito por Hastings y Kirby (1966). Tras ser transferido a un tubo de centrífuga, el digesto era desproteínizado mediante dos sucesivas fenolizaciones. En cada una de ellas se procedió a adicionar un volumen igual de una mezcla de fenol - cloroformo (1:1) (fenol saturado con un tampón Tris-ClH 20 mM, pH 7,4, conteniendo 0,1% de 8-hidroxiquinoleína), agitando el tubo suavemente durante 10 min, tras lo cual las fases eran separadas por centrifugación durante 10 min a 12.100 g. Tras la primera centrifugación se eliminaba la fase fenólica, conservando la fase acuosa mas la interfase. Tras la segunda centrifugación la fase acuosa era recogida y transferida a otro tubo de centrífuga, y sometida a precipitación alcohólica, conforme se describió en el apartado anterior.

Para eliminar todo posible residuo de fenol, el precipitado recogido era sometido a una purificación ulterior mediante sucesivos lavados con:

- +) etanol al 75%, conteniendo 1% de acetato potásico.
- +) etanol al 95%, conteniendo 1% de acetato potásico.
- +) etanol al 95%.

En cada caso se adicionaba un volumen adecuado de la solución alcohólica, se agitaba suavemente durante 5 min, y se centrifugaba en las condiciones habituales, eliminando el sobrenadante. El sedimento final era secado parcialmente con corriente de nitrógeno, y redissuelto en un volumen adecuado de solución tampón de electroforesis.

4.2. Medida de la concentración en ácidos nucleicos.

La estimación del contenido en ácidos nucleicos de una muestra purificada se realizó por análisis espectrofotométrico, midiendo la absorción a luz U.V. 260 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 1,5 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. Previamente el fondo de absorción del medio de redisolución empleado (tampón de electroforesis) era medido, y deducido de la absorción obtenida para las muestras problema.

Para estimar la concentración en ácidos nucleicos de la muestra, a partir de su valor de absorción, se adoptó la relación $50 \mu\text{g/ml} = 0,9 \text{ D.O.}$ Dicha relación fue obtenida con anterioridad mediante una curva de calibrado, utilizando soluciones de diferente concentración de ácidos nucleicos comerciales.

4.3. Condiciones de marcado radiactivo.

4.3.1. Proteínas.

El marcado de las proteínas glandulares se realizó " in vitro ", por incubación de las glándulas durante 20 min en medio C.R. conteniendo $750 \mu\text{Ci/ml}$ de lisina- H^3 .

4.3.2. RNA.

El marcado del RNA glandular se realizó " in vivo " o " in vitro ".

" In vivo ", se llevó a cabo por adición de uridina- H^3 y citidina- H^3 al medio de cultivo, en una proporción de $10 \mu\text{Ci}$ de cada nucleósido por mililitro del medio.

" In vitro ", se llevó a cabo incubando las glándulas en medio C.R. o en medio de Cannon, conteniendo uridina- H^3 a concentración y tiempo variables.

4.4. Estimación de la radiactividad ácido - soluble intracelular.

Esta técnica ha tenido como finalidad medir el total de radiactividad intracelular no incorporada en macromoléculas, tras un marcado " in vitro " con uridina- H^3 . El método empleado para ello ha consistido en una adaptación a nuestro sistema biológico del descrito por Tamm et al. (1976) para células de mamíferos.

Tras el marcado, el medio de incubación conteniendo la uridina- H^3 era retirado. Para eliminar en lo posible todo residuo de radiactividad en el pocillo o externamente adherido a las glándulas, estas eran sometidas sucesivamente a tres lavados, adicionando cada vez 1 ml del medio de incubación, en frío. (El tiempo total de estos lavados suponía aproximadamente 6 min). Posteriormente las glándulas eran fijadas adicionando 1 ml de TCA al 10%, en frío, durante 10 min. La radiactividad ácido - soluble era estimada entonces, tomando alícuotas de 50 μ l del medio de fijación, que eran depositadas en filtros de fibra de vidrio GF/A.

4.5. Estimación de la radiactividad incorporada en macromoléculas.

La actividad de síntesis de proteínas o RNA ha sido estimada

a partir de la tasa de incorporación en macromoléculas del precursor radiactivo apropiado, medida tal incorporación como radiactividad ácido-insoluble.

4.5.1. Incorporación en proteínas.

Las proteínas fueron extraídas por digestión química de las glándulas salivales. El método de extracción y valoración aquí utilizado ha sido básicamente el descrito por Clever et al. (1969).

Tras el marcado con lisina- H^3 , el medio de incubación era retirado y las glándulas fijadas con TCA al 10% conteniendo 0,1% de lisina, durante 5 min, en frío. Tras ello, eran digeridas en 1 ml de NaOH 1M, durante 20 min, a 45°C.

Para medir la radiactividad ácido-insoluble se tomaban alícuotas de 100 μ l del digesto, adicionando a cada una de ellas 25 μ l de albúmina bovina y 100 μ l de TCA al 40% conteniendo 0,1% de lisina, y haciendo precipitar con exceso de TCA al 5% conteniendo 0,1% de lisina, durante 15 min, en frío. Los precipitados eran recogidos por filtración en filtros de fibra de vidrio GF/C, y lavados con amplios volúmenes del medio usado para precipitar.

4.5.2. Incorporación en RNA.

Tras el marcado radiactivo, las glándulas eran fijadas y los ácidos nucleicos extraídos por digestión enzimática y, eventualmente, purificados, conforme ha sido anteriormente descrito (véase 4.1.). Para valorar la radiactividad áci-

do-insoluble, bien sea directamente sobre el digesto o sobre el extracto purificado, se tomaban alícuotas de la muestra a las que se adicionaba 25 μ g de RNA comercial, precipitando con TCA al 5% en exceso, durante 15 min, en frío. Los precipitados eran entonces recogidos por filtración en filtros de fibra de vidrio GF/C, siendo lavados con amplios volúmenes de TCA al 5%.

Cuando paralelamente se deseaba valorar la radiactividad total de la muestra, se tomaban alícuotas de la misma, que eran directamente depositadas en filtros de fibra de vidrio GF/A.

4.6. Medida de la actividad RNA polimerasa.

La técnica aquí utilizada es una adaptación realizada en nuestro laboratorio para estudios bioquímicos (Vadillo, 1978) del método citológico usualmente empleado para el ensayo " in situ " de la actividad RNA polimerasa endógena en células fijadas (Moore, 1971 y 1978; Moore y Ringertz, 1973).

Las glándulas salivales eran fijadas durante 5 min en una mezcla de etanol - acetona (1:1), siendo a continuación lavadas repetidamente en un tampón Tris-ClH 0,1M, pH 7,9, conteniendo:

sacarosa 0,15M

mercaptoetanol 12 mM

Cl₂Mg 12 mM

Las glándulas eran entonces incubadas durante 20 min a 37°C en 100 μ l de mezcla reactiva. La composición de esta

mezcla era 300 nmoles de cada uno de los nucleótidos ATP, GTP, CTP, y 24 nmoles de UTP- H^3 , en 0,5 ml del tampón antes indicado. Tras la incubación, las glándulas eran sometidas a una postfijación durante 5 min con etanol absoluto frío conteniendo pirofosfato sódico 10 mM, y lavadas luego brevemente con etanol al 70%. Finalmente los ácidos nucleicos eran extraídos y purificados por simple precipitación alcohólica, y la radiactividad incorporada en RNA era valorada, según ha sido anteriormente descrito (4.1.2., 4.1.3. y 4.5.2.).

4.7. Contaje de la radiactividad.

Los filtros, en los que la muestra radiactiva había sido recogida, eran introducidos en miniviales de vidrio de 3 ml de capacidad, y secados en la estufa a 90 - 100°C durante 1 h. Tras ello eran llenados con 2,5 ml de mezcla de centelleo (tolueno conteniendo 5% de butil-PBD), y la radiactividad medida en un contador de centelleo líquido.

4.8. Análisis electroforético.

El análisis de los ácidos nucleicos ha sido llevado a cabo mediante geles de agarosa en columna. El sistema empleado ha consistido en una técnica personal elaborada a partir de los métodos descritos por Steinemann (1971) y Eström y Tanquay (1974).

4.8.1. Solución tampón de electroforesis.

Con tal finalidad se ha empleado un tampón Tris- BO_3H_3 90 mM, pH 8, conteniendo además:

EDTA 2,5 mM

0,1% de SDS.

4.8.2. Preparación de los geles.

La agarosa era disuelta en el tampón de electroforesis por calentamiento en un autoclave (a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min). Habitualmente se empleaba una concentración del 1% en agarosa.

Para preparar los geles, la solución de agarosa era vertida en tubos de cuarzo de 6 mm de diámetro interno y 17 cm de longitud, dispuestos verticalmente, hasta aproximadamente 1,5 cm del borde superior. A fin de prevenir la desecación del gel, el resto de la columna era completada con agua destilada. Las columnas eran dejadas gelificar durante toda la noche a 37°C.

4.8.3. Preparación de la muestra.

Los extractos de ácidos nucleicos, tras ser purificados por precipitación alcohólica, eran redisoluidos en un volumen apropiado del tampón de electroforesis conteniendo 5% de sacarosa. Para la separación electroforética se tomaban alícuotas de 50 μ l, que contenían el equivalente al contenido de 2 - 3 glándulas en ácidos nucleicos, y 10 μ g de rRNA exógeno no marcado de levadura.

4.8.4. Condiciones de la separación electroforética.

El proceso de separación se llevó a cabo en el interior de una

cámara fría, a 4°C.

La fracción superior de las columnas (interfase agua - gel) era eliminada, y los geles sometidos entonces a un lavado previo (preelectroforesis) en un campo eléctrico de 4 mA/gel durante 30 min. Las muestras eran entonces colocadas en la parte superior de cada columna, y los ácidos nucleicos separados, sucesivamente, en un campo eléctrico de:

- +) 2 mA/gel, durante 30 min (electroforesis A)
- +) 4 mA/gel, durante - habitualmente - 45 min (electroforesis B).

4.8.5. Procesamiento de los geles. Perfiles de absorción y radiactividad.

Tras la separación electroforética, los geles eran sometidos a un barrido por un haz de luz U.V. 254 nm, obteniéndose así los perfiles de absorción.

Tras ser extraídos de sus tubos de cuarzo, los geles eran, por lo general, sometidos a fijación con TCA al 5% durante 2 h, a 4°C, y posteriormente lavados durante toda la noche en un volumen amplio de agua destilada. Tanto el TCA como el agua eran mantenidos en agitación constante mediante un agitador magnético. Cada gel era entonces cortado en fracciones de 1 mm con un cortador de geles, y cada dos fracciones depositadas en un minivial de vidrio de 3 mm de capacidad. Los miniviales eran completados con 2,5 ml de una mezcla de centelleo compuesta por:

Solueno 350	50	ml
PPO	6	g
POPOP	0,2	g
Metanol	20	ml

Tolueno : completando hasta 1 litro.

Las muestras eran dejadas digerir durante toda la noche a 37°C. Los perfiles de radiactividad se obtenían por contaje de las muestras en un contador de centelleo líquido.

5. CONDICIONES DE ESTERILIDAD.

La extracción y procesamiento del RNA se llevaba a cabo habitualmente en presencia de SDS, para minimizar toda posible acción degradativa por parte de las nucleasas. Para una mayor protección, todos los procesos se desarrollaban, en lo posible, en condiciones de esterilidad.

Soluciones

Las soluciones tampón, soluciones salinas y medios de incubación, fueron esterilizados habitualmente al autoclave (a 120°C y 1 atmósfera de presión, durante 20 min).

El medio de Cannon, por incluir sustancias termodegradables, era esterilizado por filtración, utilizando una bomba de vacío, y a través de filtros Millipore de 0,45 μ m de tamaño de poro.

Instrumental

El instrumental de vidrio resistente a altas temperaturas fue esterilizado por calor seco, en una estufa a 180°C durante 2 h.

El material de plástico, metálico, y de vidrio no resistente, fue esterilizado al autoclave o expuesto a una radiación con luz U.V. germicida.

6. MATERIALES.

6.1. Productos químicos.

Se incluyen aquí solamente aquellos productos químicos cuyas características detalladas y referencia comercial pueden resultar de interés.

a.- Componentes del medio de Cannon.

Todos los componentes del medio de Cannon (sales inorgánicas, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, complejo vitamínico B, y otros componentes) han sido obtenidos de Merck. Se exceptúan la colina, de Serva Feinbiochemica, y la penicilina (G sódica cristalizada), de la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos, S.A.

b.- Drogas

La actinomicina D (actinomycin D, grade III), α -amanitina, DMSO (dimetyl sulfoxide, grade I), provienen de Sigma. La cicloheximida (actidione, from Streptomyces griseus), de Koch - Light Laboratories; y la anisomicina, de Pfizer.

c.- Nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos.

La uridina se adquirió de Koch - Light Laboratories.

El ATP (adenosine 5'-triphosphate, disodium), CTP (cytidine 5'- triphosphate, disodium), GTP (guanosine 5'- triphosphate, disodium) provenían de Schwarz/Mann. El RNA (Ribonucleic acid from yeast, type XI), de Sigma. El rRNA utilizado como marcador en los geles de electroforesis fue obtenido por desproteinización de ribosomas de levadura, donados por el Dr. A. Jiménez.

d.- Enzimas.

La DNasa (deoxyribonuclease I, from bovine pancreas) provenía de Calbiochem, y la RNasa (ribonuclease A, type I, from bovine pancreas), de Sigma Chemical Chemical Co. La pronasa (pronase, free of nucleases, B grade) se adquirió de Calbiochem, y la proteinasa k de Merck.

e.- Productos radiactivos.

La citidina- H^3 : (5- 3H)Cytidine , de actividad específica 25-30 Ci/mmol; la uridina- H^3 : (5,6- 3H)Uridine, de actividad específica 40-60 Ci/mmol; la lisina- H^3 : L-(4,5(n)- 3H)Lysine, de actividad específica 10-30 Ci/mmol; y el UTP- H^3 : (5- 3H)Uridine 5'- triphosphate, ammonium salt, de actividad específica 10-30 Ci/mmol, se obtuvieron de Amersham.

Para evitar las posibles incidencias de una variación en la radiactividad específica, para cada experimento o experi-

mentos de una misma serie, se utilizó el mismo lote del producto radiactivo.

f.- Determinación de la radiactividad.

El butil-PBD se obtuvo de Ciba Limited. El tolueno, de FEROSA.

g.- Análisis electroforético.

La agarosa (agarosa C) fue una donación de Pronadisa. La sacarosa empleada (sucrose p.A., ribonuclease free) se obtuvo de Serva. El solueno (soluene 350) se adquirió a Packart Instrument. El PPO y POPOP se adquirieron a Inter-technique.

6.2. Equipo.

- +) Agitador magnético: Selecta.
- +) Agitador de tubos: Gri Gel.
- +) Balanzas: Mettler, modelos P1210 y H54.
- +) Calculadora: Hewlett-Packard 45.
- +) Baño: Memmert.
- +) Centrífuga: Servall, con un rotor tipo SS-34.
- +) Equipo de electroforesis:
 - Cubeta : Savant Instruments.
 - Fuente de alimentación: ISCO, modelo 490.
 - Lector de geles: ISCO, modelo 659.
 - Monitor de absorción: ISCO, modelo UA-5
 - Cortador de geles: Mikle Laboratory
- +) Lámpara germicida : Sylvania.

- +) Equipo de filtración por vacío: Millipore.
- +) Espectrofotómetros: Guilford 2400 y Spectronic 710.
- +) Estufa: Selecta, modelo 203A.
- +) Contador de centelleo líquido: Intertechnique, modelo SL32.
- +) Fotomicroscopio: Zeiss.
- +) Lupa: Nikon.
- +) Microscopio: Zeiss.
- +) pHmetro: Radiometer, modelo PHM62.

6.3. Otros materiales.

- +) Cubetas para espectrofotometría: TSL.
- +) Filtros de papel de fibra de vidrio: Whatman, GF/A y GF/C.
- +) Material para autorradioagrafías:
 - película AR-10 de Kodak
 - revelador D-19 de Kodak
 - fijador ultrarápido de Kodak.
- +) Película para fotografías: Panatomic X, 17 DIN, de Kodak.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS PRELIMINARES.

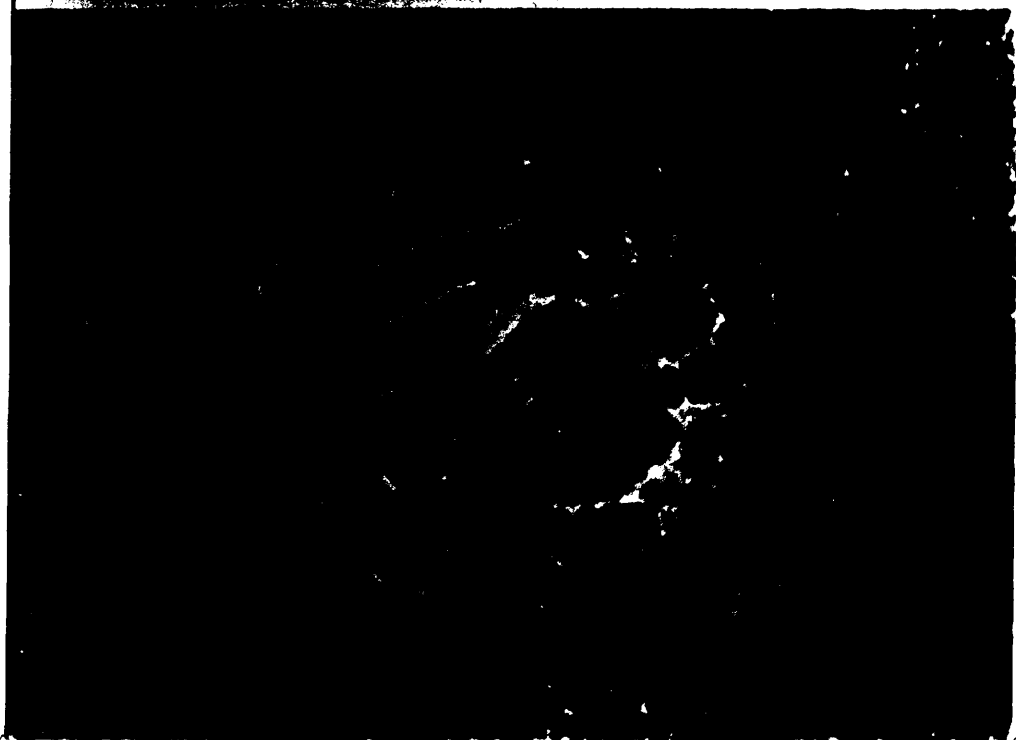
1.1. La glándula salival de Chironomus.

Las glándulas salivales de Chironomus constituyen dos estructuras de forma arriñonada, de dimensiones 0,75 - 1 mm de longitud y 0,3 - 0,4 mm de anchura, situadas a ambos lados del inicio del tubo digestivo larvario. Aunque están formadas por distintos tipos de células (véase Kloetzel y Laufer, 1969), la gran mayoría de su actividad metabólica radica en las grandes células politenizadas que, en número aproximado de 30, se disponen periféricamente formando una monocapa, en tanto que su producto de secreción es vertido y se almacena en el centro de la glándula. Un detalle de un lóbulo de una glándula salival puede observarse en la fig. 1a. Las células aparecen bien individualizadas, y los cromosomas politénicos se aprecian como fibras oscuras en el interior de los núcleos.

El genoma de estas células está constituido por cuatro grandes cromosomas politénicos. (fig.1b). Como la dotación de estas especies es $2n = 8$, es de notar entonces que lo que aquí denominamos " cromosoma politénico " es, en realidad, el resultado de un apareamiento íntimo de cada par de homólogos. Por lo demás, lo más destacable desde un punto de vista citológico es la presencia de un gran nucleolo y, dentro de su espectro de puffing, de grandes anillos de Balbiani (BRs). El genoma de Ch. pallidivittatus presenta su nucleolo sobre el cromosoma II, y tres BRs, numerados sucesivamente como 2,1 y 3 (Beermann,

Figura 1.- En a, detalle de un lóbulo de una glándula salival de *Ch. pallidivittatus*. La masa fibrilar oscura dentro de los núcleos corresponde a los cromosomas politénicos.

En b, a mayor aumento, se muestra el genoma de una de las células.



1962), sobre el cromosoma IV (fig. 2a). Por el contrario, en el caso de *Ch. thummi*, tanto el nucleolo como sus dos BRs (de numeración 2 y 1, según Santa-Cruz et al., 1978), aparecen localizados en el cromosoma IV (fig. 2b).

1.2. Extracción y purificación del RNA glandular.

Dada la pequeña masa de tejido que supone la glándula salival de *Chironomus*, la homogeneización del material por medios mecánicos sería sumamente dificultosa. De ahí que hayamos recurrido a la utilización de métodos químicos o enzimáticos: digestión con NaOH para extraer las proteínas, y con un enzima proteolítico para la extracción de ácidos nucleicos.

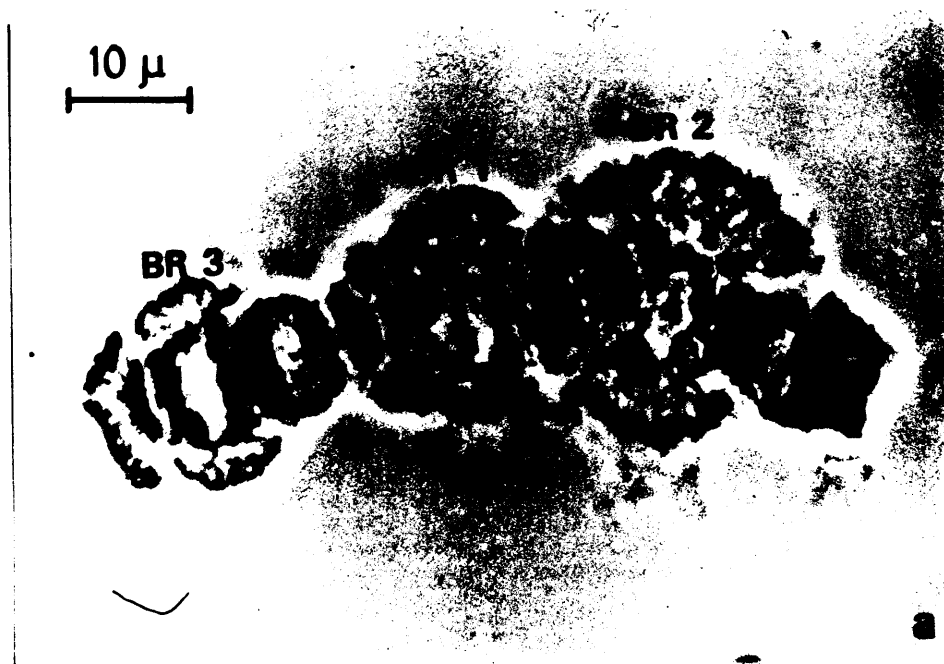
1.2.1. Rendimiento comparado de la extracción utilizando proteinasa K y pronasa.

El enzima utilizado casi exclusivamente para extraer el RNA en nuestro sistema biológico ha sido la pronasa (Daneholt, 1970; Pelling, 1970). Sin embargo la extracción de ácidos nucleicos ha sido llevada a cabo en otros materiales utilizando proteinasa K. Con tal motivo, el primer paso ha consistido en estudiar comparativamente el rendimiento de la extracción del RNA glandular utilizando uno u otro enzima.

Dos grupos de glándulas procedentes de larvas aproximadamente iguales del mismo cultivo fueron marcados " in vitro " durante 20 min en medio C.R. conteniendo 750 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos del primer grupo fueron extraídos

Figura 2.- En a, cromosoma IV de una célula polite-
nizada de glándula salival de Ch. pallidivittatus.
Obsérvense los 3 anillos de Balbiani (BRs 2, 1, 3).

En b, el cromosoma IV correspondiente a
Ch. thummi, mostrando, además de los 2 anillos de
Balbiani (BRs 2 y 1), un gran nucleolo (N).



en 1 ml de medio conteniendo proteinasa K, y los del segundo grupo en 1 ml de medio conteniendo pronasa (véase Material y Métodos, 4.1.2.). Tras valorar la radiactividad ácido-insoluble, el remanente no utilizado de los digestos fue sometido a purificación exhaustiva (Material y Métodos, 4.3.1.), y la radiactividad ácido-insoluble de las soluciones finales valorada nuevamente.

Los valores obtenidos se recogen y comparan en la tabla 1. Como puede observarse, la extracción del RNA total glandular se muestra mucho más efectiva en presencia de pronasa, por lo que este enzima fue definitivamente adoptado como método de extracción para los experimentos posteriores.

1.2.2. Cinética de la extracción con pronasa.

Se trató a continuación de encontrar las condiciones de tiempo mínimo que proporcionan un rendimiento máximo de extracción del RNA glandular. Esto tenía como objeto el evitar que una digestión innecesariamente prolongada pudiera dar lugar a una degradación parcial del RNA, cosa de especial interés cuando se tratara de llevar a cabo una caracterización electroforética del mismo.

Tras ser marcadas " in vitro " durante 30 min en medio de Cannon conteniendo $2.500 \mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 , las glándulas fueron fijadas en etanol absoluto y transferidas entonces a un tubo de centrífuga conteniendo 2 ml de medio de digestión. A tiempos de 5, 10, 20, 40, 60 y 120 min se tomaron alícuotas

Valoración	cuentas/glándula		$\frac{\text{protein.K}}{\text{pronasa}} \times 100$
	protein.K	pronasa	
Tras digestión	168	760	22
Tras purificación	75	437	17

Tabla 1.- Rendimiento de la extracción enzimática de RNA.

Tras un breve marcado " in vitro " con uridina- H^3 , los ácidos nucleicos de glándulas salivales de Ch. pallidivittatus fueron extraídos en presencia de proteinasa K o pronasa, siendo posteriormente purificados, y valorándose la radiactividad ácido-insoluble.

para valorar la radiactividad ácido-insoluble. Antes de cada toma, el digesto era centrifugado a 480 g durante 2 min, para hacer sedimentar todo posible resto glandular no digerido, que era desprendido tras la toma por agitación del tubo.

Los valores obtenidos, expresados como radiactividad por glándula, se resumen en la fig. 3. Como puede observarse, en condiciones de fijación con etanol, un valor máximo para la extracción del RNA en presencia de pronasa se obtiene ya a los 10 min de digestión. Por otro lado, a tiempos superiores a 20 min parece existir una pequeña caída en la radiactividad incorporada. No es excluible que esto pueda deberse, al menos en parte, a una degradación parcial del RNA, como se indicó anteriormente.

1.2.3. Caracterización del grado de pureza en ácidos nucleicos.

Para comprobar si los métodos descritos de purificación (Material y Métodos, 4.1.3.) dan como resultado soluciones de un adecuado grado de pureza en ácidos nucleicos, dos grupos de 60 glándulas fueron sometidos a digestión en presencia de pronasa. Uno de los digestos (a) fue purificado por simple precipitación alcohólica, en tanto que el segundo (b) lo fue mediante la técnica de purificación exhaustiva. En ambos casos se prescindió, al precipitar, de la adición de RNA exógeno. Los extractos finales fueron redissueltos en 1 ml de tampón de electroforesis. Como control (c) se empleó una solución de RNA comercial puro, 40 µg/ml, en el mismo tampón.

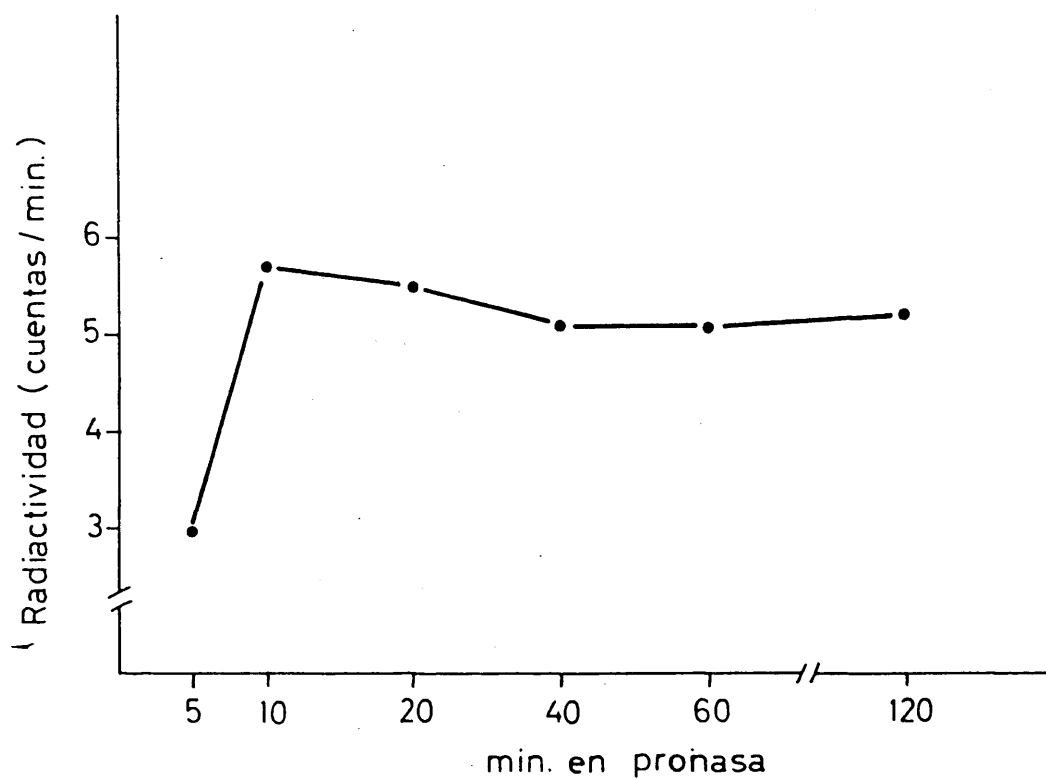
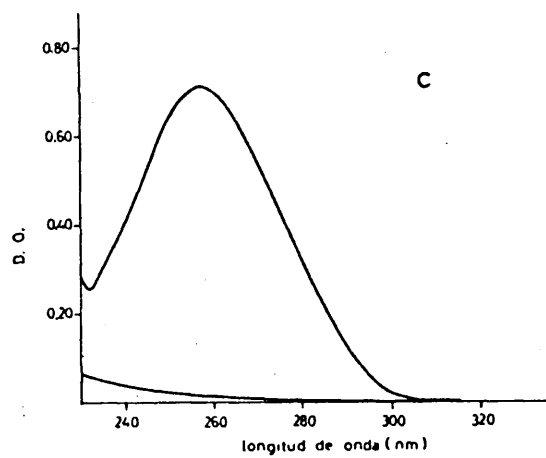
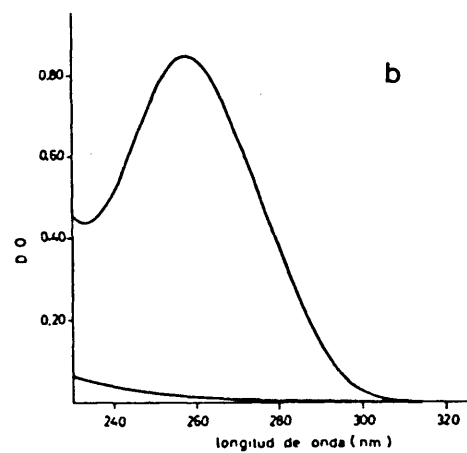
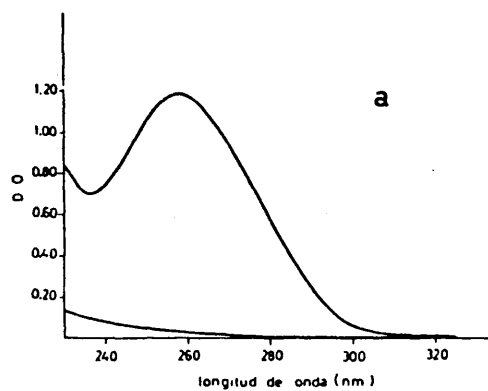


Figura 3.- Cinética de la extracción de RNA en presencia de pronasa. Glándulas de *Ch. thummi* brevemente marcadas con uridina- H^3 y fijadas con etanol absoluto fueron digeridas en medio conteniendo pronasa, y la radiactividad ácido-insoluble del digesto valorada en los tiempos indicados en ascisas. En ordenadas, los valores de radiactividad son expresados como cuentas por glándula.

De cada una de las soluciones se obtuvo un espectro continuo de absorción, por lectura a luz U.V. entre longitudes de onda de 230 y 320 nm. Dichos espectros se representan en la fig. 4. Se puede observar, en primer lugar, que los perfiles de las muestras de ácidos nucleicos glandulares (a,b) presentan una clara semejanza con el perfil de la solución control (c). Además, en todos los casos se alcanza un máximo de absorción a longitud de onda aproximadamente a 260 nm, y las curvas muestran una perfecta configuración sin que existan indicaciones de una sensible contaminación con restos de proteínas o fenol. Por todo ello podemos concluir que los procedimientos de purificación empleados - incluso la simple precipitación alcohólica - proporcionan soluciones adecuadamente puras en ácidos nucleicos.

Como prueba adicional, se midieron los valores de absorción a luz U.V. 260 y 280 nm de varias muestras de varias muestras de ácidos nucleicos glandulares sometidos a purificación exhaustiva. Como control, dicha absorción fue también medida para soluciones de RNA comercial puro de concentraciones 15, 25 y 40 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos, así como las relaciones de absorción 260/280 se recogen en la tabla 2. La obtención de relaciones aproximadamente igual a 2, y esencialmente semejantes a las obtenidas con RNA comercial, confirma el elevado grado de pureza de los extractos purificados de ácidos nucleicos glandulares.

Figura 4.- Espectro de absorción de ácidos nucleicos.
Extractos de ácidos nucleicos de glándulas salivales fueron purificados mediante simple precipitación alcohólica (a), o por purificación exhaustiva (b). La absorción fue leída de modo continuo a luz U.V., y los perfiles resultantes comparados con el obtenido de una solución de RNA comercial de levadura (c). La línea inferior en cada gráfico corresponde a la absorción del tempón empleado.



	D.O.		$\frac{260}{280}$
	260 nm.	280 nm.	
Glándulas (muestra n°)			
1	0,266	0,128	2,07
2	0,315	0,149	2,11
3	0,349	0,170	2,05
RNA comercial			
15 $\mu\text{g/ml}$	0,124	0,053	2,33
25 $\mu\text{g/ml}$	0,231	0,110	2,1
40 $\mu\text{g/ml}$	0,357	0,157	2,27

Tabla 2.- Estimación del grado de pureza en ácidos nucleicos. Ácidos nucleicos procedentes de glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron purificados, y medida su absorción a luz U.V. 260 y 280 nm. Los valores alcanzados son comparados con los obtenidos a partir de un RNA comercial de levadura. La absorción fue medida en cubetas de 0,5 cm de paso de luz.

1.3. Incorporación de uridina-H³ en RNA.

1.3.1. Caracterización enzimática de la radiactividad incorporada.

Pese a la naturaleza del nucleósido radiactivo empleado (uridina-H³), no se puede excluir a priori una incorporación parcial de radiactividad en macromoléculas distintas de RNA. Una incorporación significativa en DNA, a partir de un marcado de 1 h con el nucleósido arriba indicado, ha sido medida en nuestro laboratorio, utilizando material vegetal (Aller et al., 1978). Por ello ha sido necesario comprobar hasta qué punto la radiactividad ácido-insoluble valorada, tras un corto pulso de las glándulas con uridina-H³, es una medida real de su incorporación en RNA.

Treinta glándulas fueron marcadas durante 20 min en medio de Cannon conteniendo 2.500 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina-H³, y el extracto purificado de ácidos nucleicos fue redisuelto en 600 μl de un tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7,4. Se tomaron entonces alícuotas de 100 μl , que fueron incubadas durante 1 h a 37°C con:

+) 25 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa libre de ribonucleasas, en Cl_2Mg 10 mM.

+) 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa A de páncreas bovino.

Como control, una alícuota igual del extracto, sin adición de enzima, fue sometida a incubación en las mismas condiciones.

Los digestos resultantes fueron purificados por simple precipitación alcohólica, midiéndose la radiactividad ácido-inso-

luble. Los valores obtenidos, reducidos a cuentas por glándula, se recogen en la tabla 3.

Como puede observarse, la radiactividad ácido-insoluble era prácticamente en su totalidad sensible a la RNasa, lo que nos ha indicado que, al menos tras períodos cortos de marcado, el isótopo se incorpora prácticamente de un modo exclusivo en el RNA glandular.

1.3.2. Cinética de la incorporación "in vitro".

Dado que muchos de los tratamientos aplicados (administración de drogas, marcado radiactivo) lo han sido bajo condiciones de incubación "in vitro", se ha hecho preciso comprobar experimentalmente la regularidad del metabolismo celular en dichas condiciones, dentro de los márgenes de tiempo de incubación empleados.

a.- Incorporación en medio C.R.

Grupos con el mismo número de glándulas, procedentes de larvas aproximadamente iguales del mismo cultivo, fueron marcados en medio C.R. conteniendo 750 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 durante 10, 20, 40, 60 y 90 min. En cada caso los ácidos nucleicos fueron extraídos y la radiactividad incorporada medida, primero directamente sobre los digestos, y posteriormente sobre los extractos ya purificados.

Los resultados obtenidos se resumen en la fig. 5, expresados relativamente al valor medido sobre el digesto correspondiente a 90 min de marcado. Como puede observarse, el creci-

Tratamiento	cuentas/glánd.	% del control
Control	6.240	
+ DNasa	6.613	106
+ RNasa	36	0,58

Tabla 3.- Caracterización enzimática de la incorporación de uridina- H^3 . Glándulas salivales de *Ch.thummi* fueron marcadas brevemente con uridina- H^3 , y fracciones iguales del extracto de ácidos nucleicos tratadas con DNasa y RNasa. Los valores obtenidos de radiactividad ácido-insoluble son comparados con el de una fracción control no tratada. Cada resultado corresponde a la media de un duplicado.

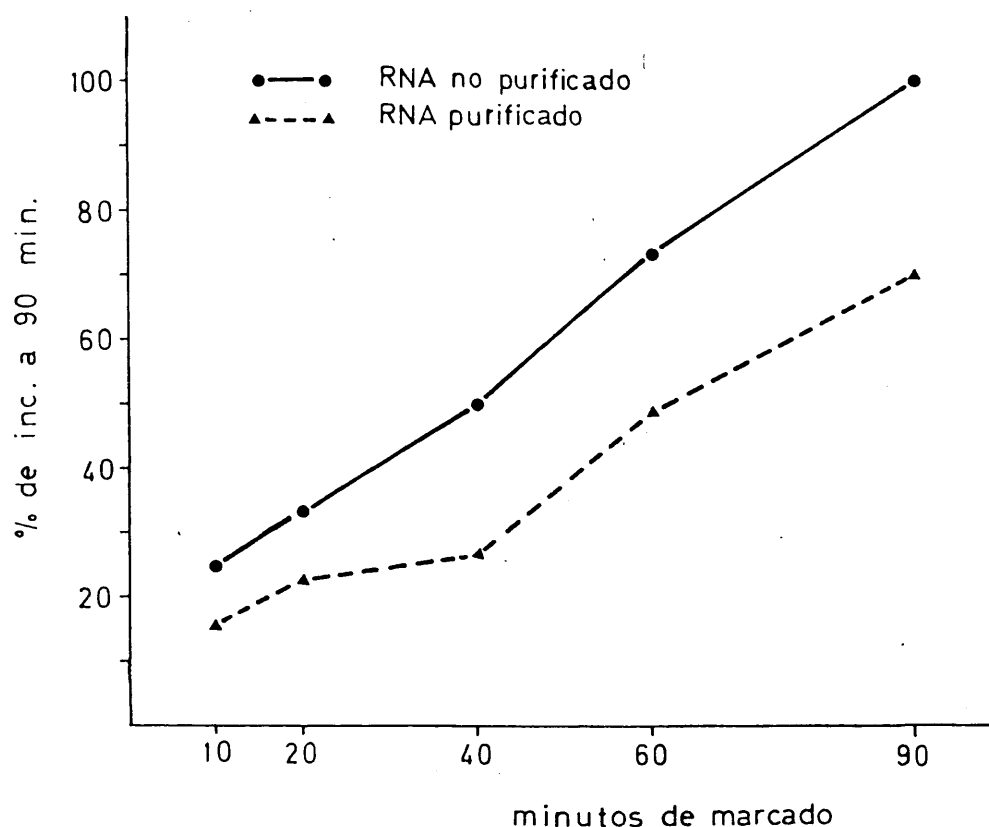


Figura 5.- Incorporación de uridina en medio C.R.
Glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron incubadas en medio C.R. conteniendo uridina- H^3 , durante los tiempos indicados en ascisas. En ordenadas se expresan los valores de radiactividad ácido-insoluble, relativamente al valor obtenido a 90 min de incubación.

Cada punto representa la media de dos experimentos.

miento de la radiactividad es prácticamente lineal con el tiempo, lo que indica que, dentro del intervalo estudiado, la actividad de transcripción " in vitro " de las glándulas en medio C.R. se mantiene normalmente. Por otro lado, es de notar el paralelismo de las cinéticas correspondientes a las mediciones sobre los digestos y sobre las soluciones purificadas. Esto nos indica, en primer lugar, que la medida directa sobre muestras no purificadas puede adoptarse como una estimación relativa adecuada de la radiactividad incorporada; y en segundo lugar, que la purificación de la muestra, pese a que se trabaja con volúmenes muy pequeños, no provoca pérdidas incontroladas de material.

b.- Incorporación en medio de Cannon.

Se efectuaron conjuntos de cuatro larvas, y las glándulas de cada conjunto fueron divididas en dos grupos de hermanas. Cada par de grupos hermanos fue marcado con 650 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 en medio de Cannon, a tiempos de amplitud consecutiva: 10 y 20 min; 20 y 60 min; 60 y 120 min; 120 y 180 min; 180 y 300 min. Los ácidos nucleicos fueron extraídos y la radiactividad ácido-insoluble de cada extracto valorada.

Los resultados obtenidos se resumen en la fig. 6, expresados relativamente al valor obtenido a 300 min de marcado. Como puede observarse, el incremento de la radiactividad incorporada es lineal hasta los 180 min de incubación, lo que parece indicar que, dentro de este intervalo de tiempo, la activi-

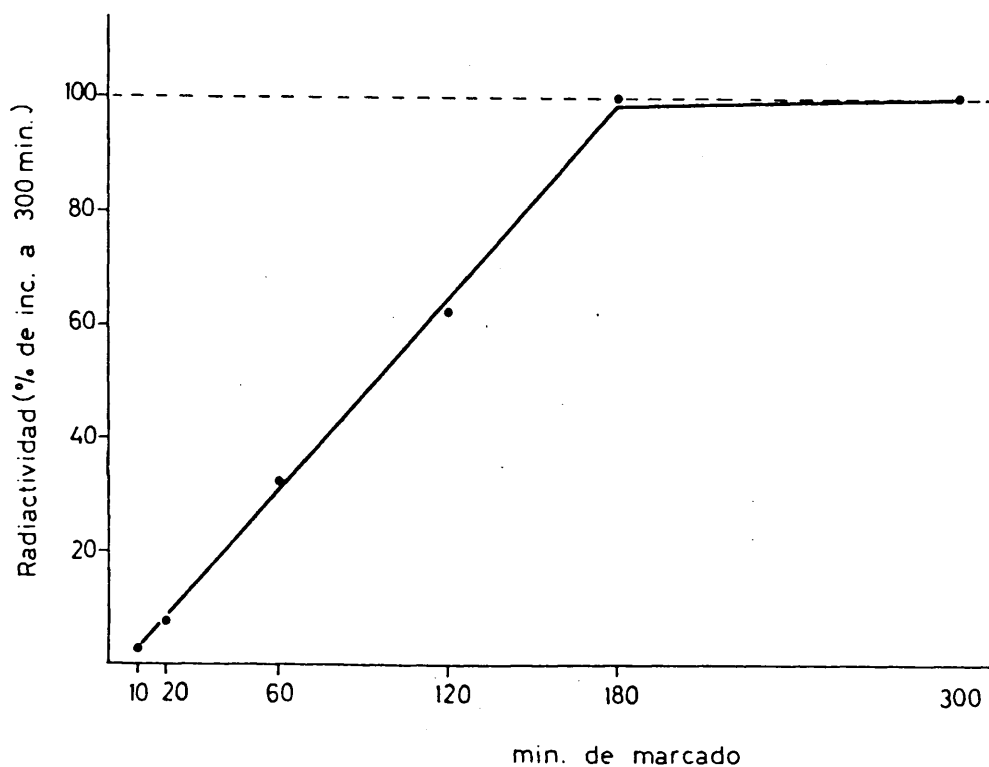


Figura 6.- Incorporación de uridina en medio de Cannon.

Glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron incubadas en medio de Cannon conteniendo uridina- H^3 , durante los tiempos indicados en ascisas. En ordenadas se expresan los valores de radiactividad ácido-insoluble, relativamente al valor obtenido a 300 min de incubación.

Cada punto representa la media de dos experimentos.

dad de transcripción "in vitro " de las glándulas en medio de Cannon se mantiene normalmente.

1.4. Análisis electroforético del RNA.

1.4.1. Perfil del RNA recién sintetizado.

Dado que en nuestros experimentos el RNA glandular ha sido brevemente marcado con uridina- H^3 , los perfiles electroforéticos obtenidos corresponden a RNA recién sintetizado. La distribución y características de las principales especies de este RNA en glándulas salivales ha sido ya objeto de consideración anterior (véase Introducción, 1.4.).

Glándulas salivales fueron marcadas durante 20 min en medio C.R. conteniendo 750 μ Ci/ml de uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos fueron extraídos, purificados, y separados por electroforesis , y los espectros de absorción y radiactividad obtenidos, por los métodos previamente descritos (Material y Métodos, 4.8.).

La fig. 7 nos muestra conjuntamente los perfiles de absorción y radiactividad correspondientes a glándulas de *Ch. pallidivittatus*. En el perfil de absorción se destacan los tres picos del rRNA de levadura adicionado como marcador: 28S, 18S y 5S. En cuanto al perfil de radiactividad, coincide esencialmente con el descrito en otros trabajos para este material biológico, usando métodos similares de separación (p.e., Edström y Tanguay, 1974). En dicho perfil podemos destacar:

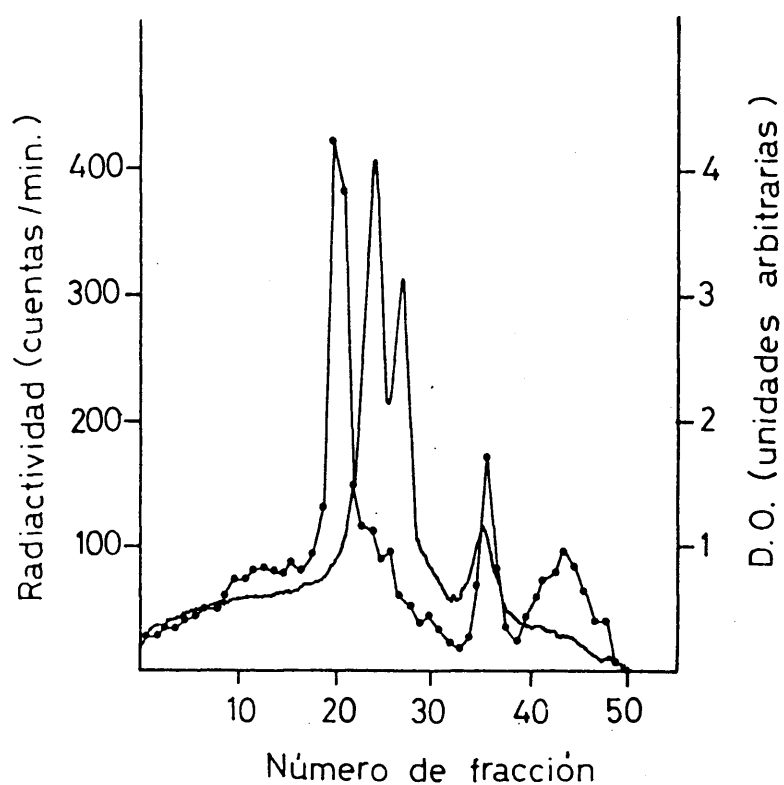


Figura 7.- Análisis electroforético del RNA recién sintetizado en glándulas salivales de Ch. pallidivittatus. Tras un corto marcado con uridina- H^3 , los ácidos nucleicos glandulares fueron extraídos y separados por electroforesis. En ● —● : perfil de radiactividad. En — : perfil de absorción a luz U.V. Este último corresponde fundamentalmente al RNA ribosomal exógeno adicionado como marcador.

+) La presencia de un pico dominante, previo al componente ribosomal mayor (28 S) que, por su colocación y dada la brevedad del marcado, corresponde presumiblemente al transcrito ribosómico inicial 38S. Este carácter de precursor se verá probado más adelante por el hecho de su desaparición en el perfil de RNA estable (fig. 12a).

+) Un segundo pico, correspondiente a la posición 5S. Se incluyen aquí las especies de RNA de bajo Pm, en especial el componente ribosomal 5S y moléculas de pre-tRNA y tRNA, que bajo estas condiciones de fraccionamiento no se separan individualmente.

+) Por último, es de destacar la fracción de hnRNA de alto Pm, que emigra a la región inicial del gel, anterior a la posición de la especie pre-rRNA 38S. Como se indicó anteriormente, su importancia es fundamental en este material biológico, por incluir los grandes mensajeros específicos.

La fig. 8 muestra el perfil de radiactividad correspondiente a *Ch. thummi*, que es esencialmente coincidente con el de *Ch. pallidivittatus*. Es de notar, no obstante, la presencia de dos picos subsidiarios, posteriores en colocación al pre-rRNA 38S. Su significado es por el momento desconocido, pues dado la brevedad del marcado con uridina- H^3 difícilmente pueden ser explicados como especies ribosomales estables. Por otro lado su aparición será habitual en los perfiles de *Ch. thummi*, especialmente en períodos largos de incubación " in

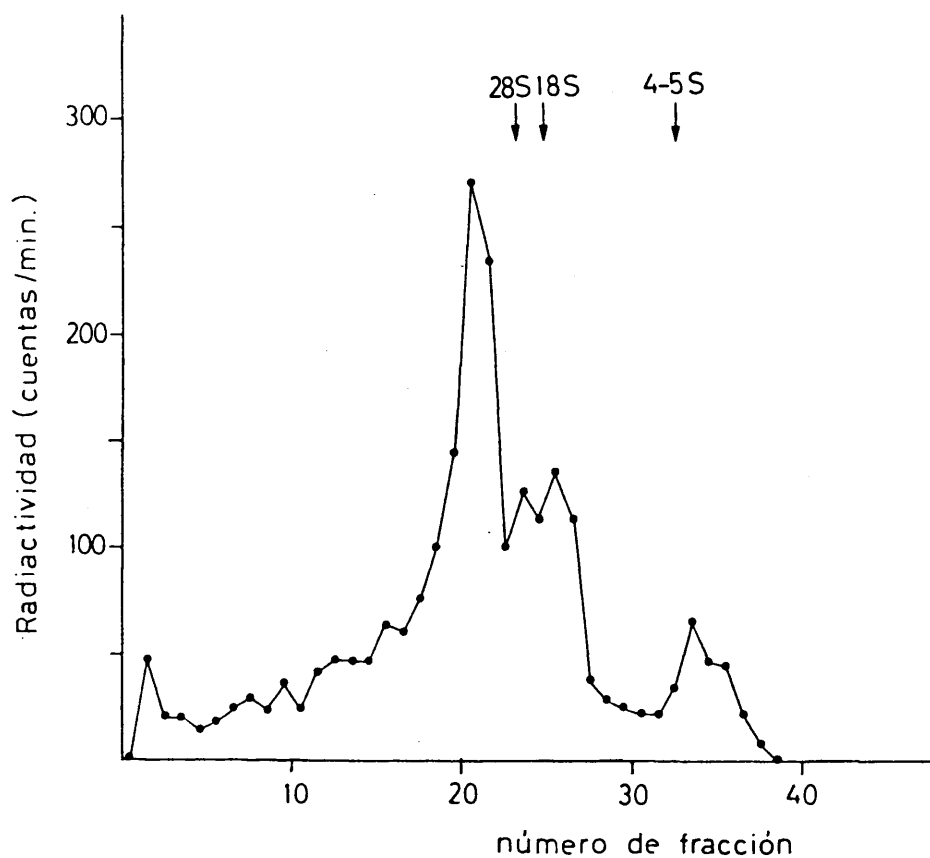


Figura 8.- Análisis electroforético del RNA recién sintetizado en glándulas salivales de Ch. thummi.

Las condiciones experimentales son las mismas que en la fig. 8. Para mayor claridad, el perfil de luz U.V. es suprimido, y la localización de sus picos indicada mediante flechas. Este criterio será el seguido en adelante.

vitro ", por lo que tampoco pueden ser explicados como un artefacto ocasional. Este problema será considerado posteriormente con más detalle.

1.4.2. Consideraciones metodológicas.

Dado que el método expuesto de electroforesis, tal como ha sido descrito, es el resultado de una modificación personal, ha sido preciso previamente encontrar las condiciones óptimas para su aplicación a nuestro material biológico. En concreto:

+) Fijar la concentración de agarosa que proporcione la separación más adecuada para las distintas fracciones principales de RNA.

+) Lograr un método de lavado del gel que, sin dar lugar a pérdidas o degradación incontroladas, proporcionen un espectro limpio de RNA, eliminando la acumulación de contaminantes radiactivos.

a.- Dependencia del perfil con la concentración de agarosa.

Alícuotas iguales de un mismo extracto de RNA glandular brevemente marcado fueron analizadas en geles de concentración 1, 1,5 y 2% en agarosa. Geles de menor concentración fueron desechados, por ser muy deformables y de difícil manejo. Las condiciones de análisis electroforético fueron las habituales, (Material y Métodos, 4.8.4.), aunque, para mejorar la separación, la electroforesis B fue ampliada a 60 min en el caso

de los geles al 1,5 y 2%. Los perfiles de radiactividad resultantes se presentan en la fig. 9.

Con el fin de estudiar la proporción relativa que cada una de las principales fracciones de RNA ocupa dentro de la longitud total del espectro, cada perfil fue dividido en cuatro regiones, correspondientes a:

+) Región de hnRNA de alto Pm: desde el comienzo del espectro hasta el inicio del pico 38 S.

+) Región del rRNA: desde el pico 38S hasta la posición 18S, inclusive.

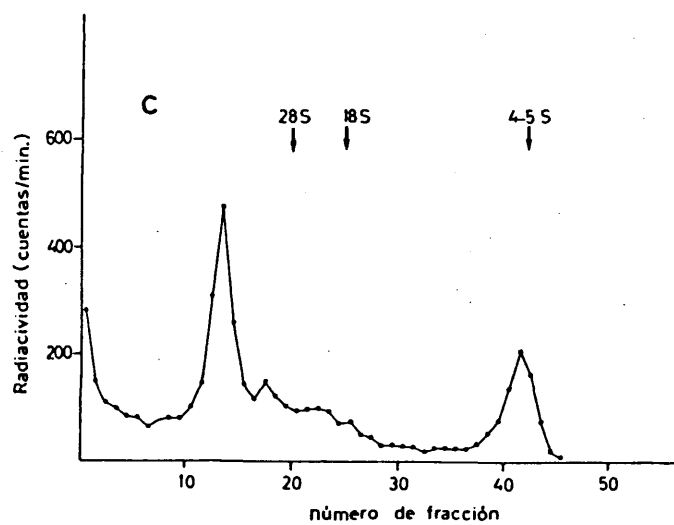
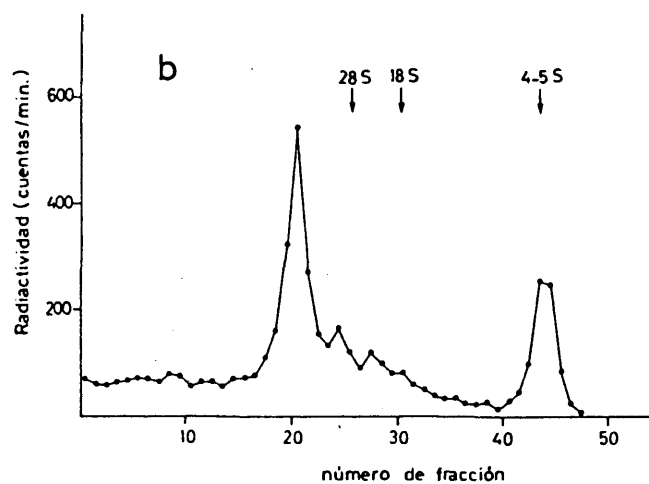
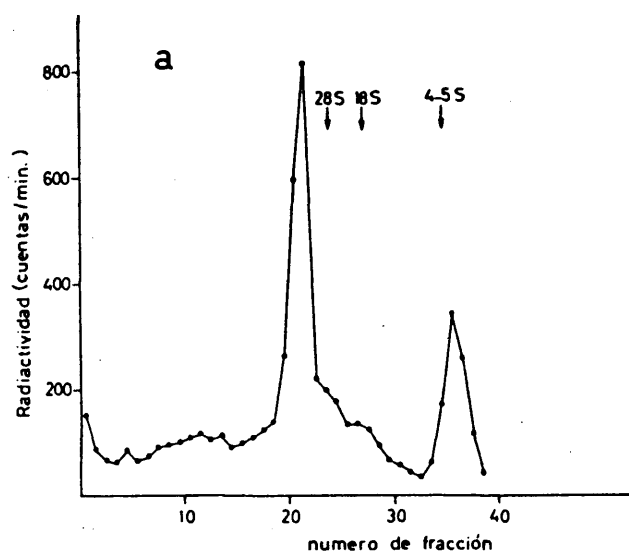
+) Región de hnRNA de mediano Pm: desde la posición 18S hasta el inicio del pico 4-5S.

+) Región de RNA de pequeño tamaño: pico 4-5S.

Las proporciones fueron obtenidas refiriendo el número de fracciones del gel comprendidas por cada región al total de las incluidas por el correspondiente perfil. Los resultados se expresan en la tabla 4.

Como puede observarse, el aumento de la concentración de agarosa da lugar a un progresivo acortamiento de la región correspondiente al hnRNA de alto Pm, que ocurre a costa del alargamiento de la región ribosomal y, especialmente, de la del hnRNA de mediano Pm. Ahora bien, dada la significación especial que en este material biológico tienen las especies de hnRNA de alto Pm (no así las de mediano Pm), tal modificación iría contra nuestros propósitos. A esto se une el

Figura 9.- Variación del perfil electroforético con la concentración de agarosa. Tras un breve marcado con uridina- H^3 , los ácidos nucleicos de glándulas salivales de Ch. thummi fueron extraídos y separados en geles de concentración 1% (a), 1.5% (b), y 2% (c) en agarosa, obteniéndose los perfiles de radiactividad.



Concentración de agarosa

Región	1 %			1,5 %			2 %		
	n° fracc.	% total		n° fracc.	% total		n° fracc.	% total	
hnRNA alto Pm	18	46		17	36		10	22	
pre-rRNA	9	23		13	27		15	33	
hnRNA medio Pm	6	15		10	21		13	29	
RNA bajo Pm (4-5S)	6	15		7	15		7	15	
Total del gel	39			47			45		

Tabla 4.- Variación del perfil electroforético con la concentración de agarosa.

Los perfiles de radiactividad representados en la fig.9 fueron divididos en cuatro regiones. En cada perfil, el número de fracciones abarcadas por cada región fue calculado y expresado como tanto por ciento del total.

que los geles de concentración creciente presentan una mayor opacidad a la luz U.V., dificultando seriamente la definición de los picos del RNA exógeno marcador añadido. Por todo ello, la concentración de 1% en agarosa ha sido adoptada como la más idónea para nuestro trabajo.

b.- Fijación y lavado del gel.

Tres alícuotas iguales de un mismo extracto de RNA glandular brevemente marcado fueron analizadas por electroforesis. Tras la lectura a luz U.V., uno de los geles (a) fue inmediatamente cortado y procesado para el conteo de radiactividad, mientras que los otros dos fueron sometidos previamente a un proceso de purificación. De ellos, el primero (b) fue fijado (2 h en TCA al 5% en frío), y lavado durante 2 h en un volumen amplio de agua destilada (conforme a Edström y Tanguay, 1974). El segundo (c) fue fijado del mismo modo, pero el lavado en agua destilada se prolongó durante toda la noche.

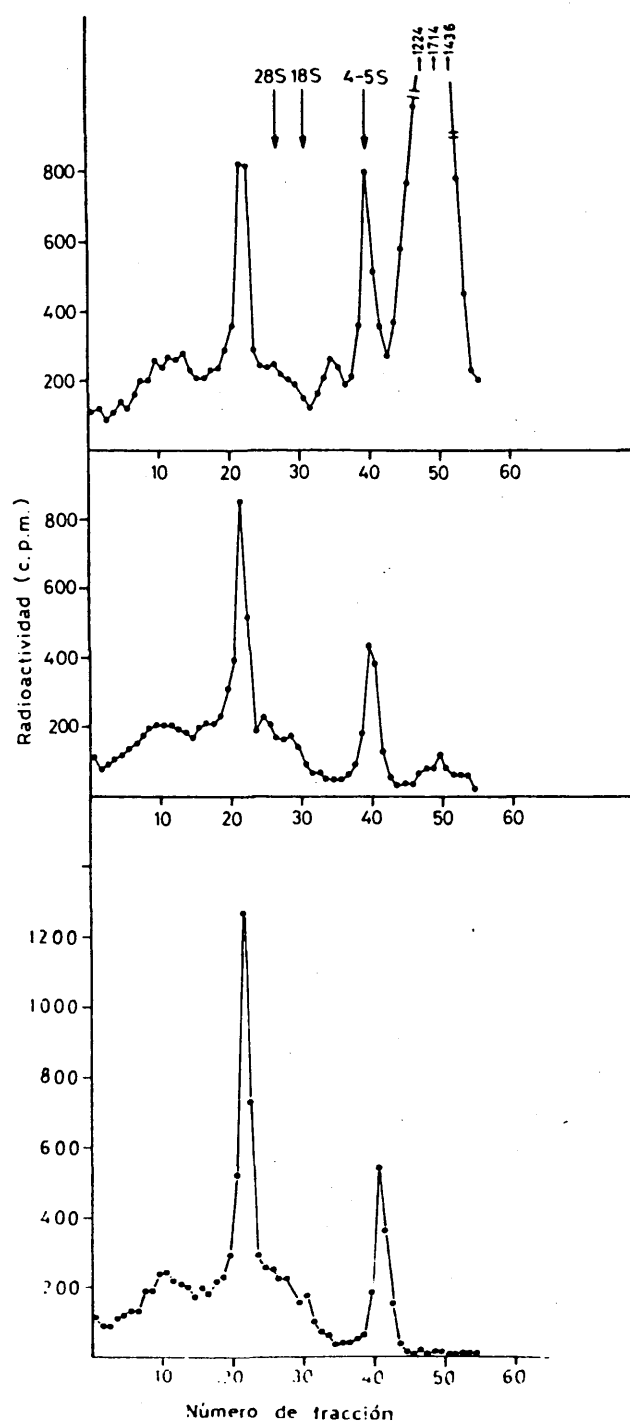
Los perfiles de radiactividad resultantes se representan en la fig 10. El primero (a), no sometido a fijación - lavado, muestra un acúmulo de radiactividad en la zona de alta velocidad de emigración, que distorsiona seriamente la región del hnRNA de mediano Pm y, especialmente, del RNA de pequeño tamaño (4-5S). Esta contaminación, presumiblemente debida a radiactividad residual no específicamente incorporada en RNA, desaparece en los perfiles procedentes de geles

Figura 10.- Modificación del perfil electroforético por el lavado del gel. Tras un breve marcado con uridina- H^3 , los ácidos nucleicos de glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron extraídos y separados por electroforesis, y los perfiles de radiactividad. obtenidos.

En a, el gel no fue fijado ni lavado.

En b, fue fijado, y lavado durante 2 h.

En c, fue fijado, y lavado durante toda la noche.

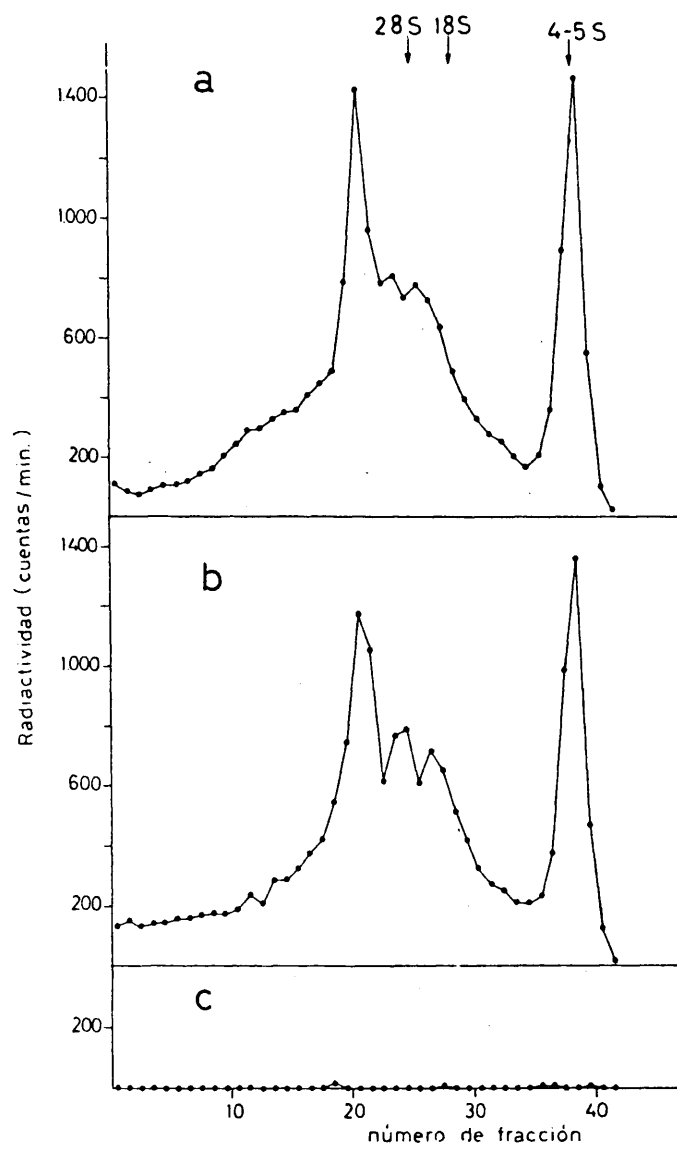


sometidos a lavado (b,c), sin que, gracias a la fijación previa con TCA, se produzca una pérdida sensible de RNA. Ni siquiera se observa pérdida o distorsión del perfil al prolongar mucho el lavado del gel (c), modificación introducida para mayor comodidad de experimentación. Por ello, la fijación de los geles en TCA y su lavado durante toda la noche ha sido el método definitivamente adoptado.

1.4.3. Caracterización enzimática del perfil de radiactividad.

Alícuotas de un mismo extracto de RNA glandular brevemente marcado fueron sometidas a digestión enzimática con DNasa y RNasa, tal como ha sido anteriormente descrito (Resultados, 1.3.1.), y los digestos resultantes purificados por simple precipitación alcohólica y analizados por electroforesis. Los perfiles de radiactividad resultantes se representan en la fig. 11. Como puede observarse, el tratamiento con DNasa (b) no modifica fundamentalmente el perfil característico del RNA recién sintetizado, medido éste a partir del control no tratado (a). Por el contrario, el tratamiento con RNasa (c) hace desaparecer completamente el perfil. Estos resultados, acordes con los previamente obtenidos por caracterización enzimática del RNA total glandular (Resultados, 1.3.1.), confirman que la totalidad del perfil radiactivo obtenido bajo nuestras condiciones de marcado y separación, corresponde a radiactividad incorporada en RNA.

Figura 11.- Caracterización enzimática del perfil electroforético. Alícuotas de un extracto de RNA brevemente marcado, procedente de glándulas salivales de Ch. thummi, fueron tratadas con DNasa (b), y RNasa (c). Los perfiles de radiactividad, obtenidos por análisis electroforético, son comparados con el de un control no tratado (a).



1.4.4. Perfil de RNA estable.

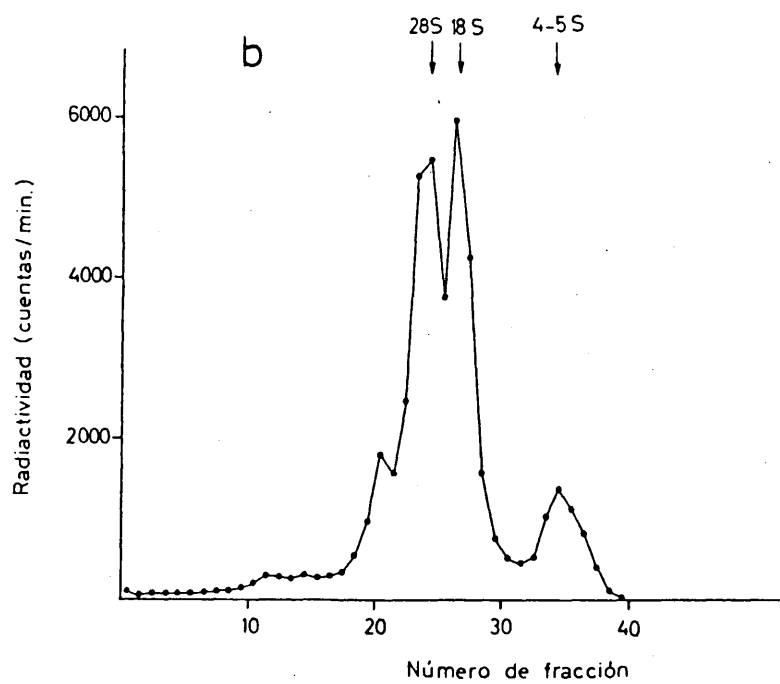
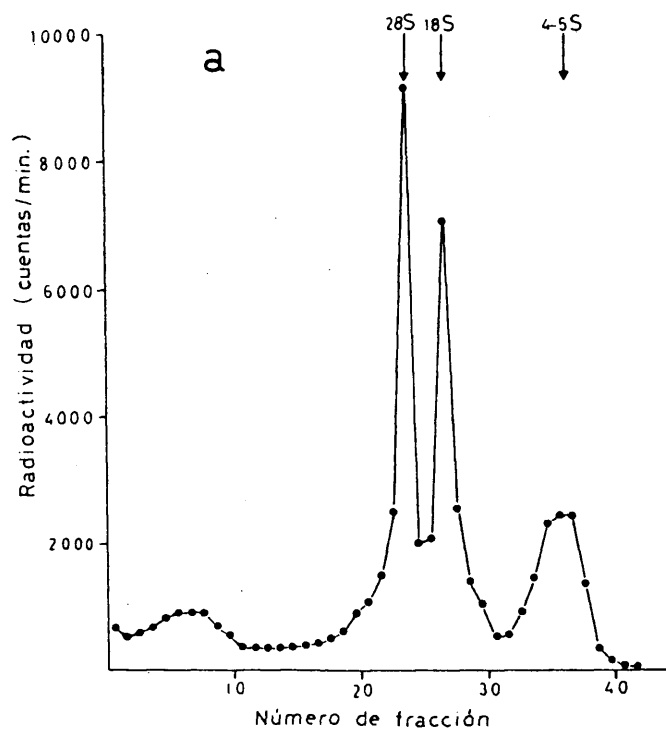
Dos grupos de larvas fueron sometidas a marcado " in vivo " del RNA durante 24 h (véase Material y Métodos, 4.3.2.). En uno de los grupos las glándulas fueron extraídas inmediatamente, en tanto que en el otro el marcado fue seguido de un período de recuperación de las larvas durante 6 días en medio sin el isótopo. En ambos casos, los ácidos nucleicos glandulares fueron extraídos y separados por electroforesis, y los perfiles de radiactividad obtenidos. La fig.12a, correspondiente a larvas donde el período de recuperación fue aplicado, muestra el perfil característico de RNA estable de glándulas salivales, que es esencialmente coincidente con los presentados en otros trabajos utilizando técnicas similares de separación (Daneholt y Hosick, 1973; Edström y Tanguay, 1974). Lo más destacable, cuando se compara con el perfil de RNA recién sintetizado, es la desaparición del precursor ribosomal 38S, apareciendo en cambio las dos formas ribosomales estables 28S y 18S. Por el contrario, cuando el período de recuperación sin isótopo no fue aplicado (fig.12b), junto a las formas ribosomales estables coexiste, como era de esperar, un pequeño pico previo correspondiente presumiblemente al pre-rRNA 38S.

1.5. Valoración relativa de la actividad de transcripción.

En el presente trabajo, los resultados son habitualmente expresados como radiactividad por glándula, modo de expresión

Figura 12.- Perfil electroforético del RNA estable.

Larvas de *Ch. pallidivittatus* (a) y *Ch. thummi* (b) fueron incubadas durante 24 h en presencia de uridina- H^3 y citidina- H^3 . Extractos de los ácidos nucleicos fueron separados por electroforesis, y los perfiles de radiactividad obtenidos. En a , tras el marcado, las larvas fueron mantenidas durante 6 días en medio sin isótopo.



comunmente utilizado en la literatura, en estimaciones cuantitativas tomando como material glándulas salivales. De todos modos, para eliminar al máximo posibles diferencias entre glándulas y obviar la incidencia de posibles pérdidas de material durante el proceso de experimentación, una consideración más exacta de los resultados exigiría expresarlos como radiactividad específica (es decir, radiactividad referida a concentración de ácidos nucleicos en la muestra). Sin embargo, diversas circunstancias dificultan la adopción de este parámetro en nuestro caso: p.e., trabajar con muy pequeños volúmenes de muestra, o muy diluida; la adición habitual de RNA exógeno, que enmascararía la cuantificación espectrofotométrica de los ácidos nucleicos glandulares; la conveniencia de reducir al máximo la manipulación de las muestras, para minimizar las posibilidades de degradación, etc.

La utilización de tratamientos comparados entre glándulas hermanas (Material y Métodos, 2.2.) ha sido un método adoptado en orden a evitar los efectos de variabilidad que resultarían de compararse resultados obtenidos con larvas distintas. De todos modos, para comprobar hasta qué punto el uso de " radiactividad por glándula " es un parámetro de exactitud aceptable, se llevó a cabo una serie de experimentos. Conjuntos de 8, 16 y 26 larvas aproximadamente iguales de un mismo cultivo fueron establecidos, y las glándulas de cada conjunto divididas en dos grupos de hermanas (a,b). Tras un breve

marcado " in vitro " (20 min en medio de Cannon conteniendo 500 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3), los ácidos nucleicos de cada grupo fueron extraídos y purificados por simple precipitación alcohólica (sin adición de RNA exógeno). En cada caso la radiactividad ácido-insoluble fue valorada, y medida la absorción a luz U.V. 260 nm . Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5. De dichos resultados podemos concluir:

a) Entre grupos de glándulas hermanas (a,b) los valores de absorción (D.O. total o D.O. por glándula) y de radiactividad (radiactividad por glándula o radiactividad por 1 D.O.) son aproximadamente iguales. Esto nos indica:

+) Que " per se " no parecen existir diferencias de importancia entre glándulas hermanas. Y, además, que las técnicas de manipulación empleadas no parecen dar lugar a pérdidas diferenciales incontroladas de material

+) Que, en consecuencia, la adopción del parámetro " radiactividad por glándula " es de un rigor comparable al de radiactividad específica, cuando se trata de comparar resultados obtenidos de glándulas hermanas.

b) Que entre glándulas procedentes de distintas larvas (confróntese, p.e., el grupo 8a con el 26a) tanto los valores de absorción (D.O. por glándula) como de radiactividad pueden diferir considerablemente. Esta limitación ha de ser tenida en cuenta cuando hayan de compararse resultados obtenidos a partir de larvas diferentes (p.e., en el caso de tratamientos aplicados " in vivo ").

n° de glándulas	Grupo	D.O. total	D.O./glánd.	cuentas/glánd.	cuentas/1D.O.
8	a	0,428	0,053	2.959	55.830
	b	0,429	0,053	3.029	57.151
	b/a	1	1	1,02	1,02
16	a	0,612	0,038	2.617	68.868
	b	0,617	0,039	2.487	63.820
	b/a	1,01	1,03	0,95	0,93
26	a	0,906	0,035	1.618	46.229
	b	0,899	0,034	1.447	42.559
	b/a	0,99	0,97	0,89	0,92

Tabla 5.- Estudio comparado de glándulas hermanas. Grupos de glándulas hermanas (a,b) procedentes de Ch. thummi fueron brevemente marcados con uridina- H^3 , y los ácidos nucleicos extraídos y purificados. Los valores de absorción (D.O. 260 nm) y radiactividad ácido-insoluble fueron obtenidos, y los de las glándulas hermanas comparados entre sí (b / a).

2. INCORPORACION DE URIDINA EN AUSENCIA DE SINTESIS DE PROTEINAS.

Una vez puestas a punto las técnicas fundamentales, nos centraremos en el estudio del efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas, por aplicación de cicloheximida y anisomicina, sobre la actividad de transcripción.

2.1. Efecto " in vivo " de la cicloheximida sobre la incorporación de lisina- H^3 y uridina- H^3 .

Con el fin de obtener una primera información acerca del efecto de la CHM sobre la síntesis de proteínas y RNA, larvas aproximadamente iguales de un mismo cultivo fueron tratadas " in vivo " con 10 μ g/ml de dicha droga. Esta concentración fue la elegida por haber sido anteriormente utilizada en estudios citológicos (Clever, 1967; Díez y Stockert, 1976). A las horas de tratamiento 3, 6 y 24, se sacrificaron varias larvas, y sus glándulas fueron marcadas durante 20 min en medio C.R. conteniendo 750 μ Ci/ml de lisina- H^3 o uridina- H^3 , valorándose entonces la radiactividad incorporada, respectivamente, en proteínas o en RNA. Como control, se utilizaron larvas no tratadas con la droga.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 6, expresados como cuentas por glándula, y relativamente al control. Puede observarse claramente que:

+) La incorporación de lisina se ve ya inhibida, en más de un 70% a 3 h de tratamiento, lo que parece confirmar que

Horas en CHM	Lisina-H ³		Uridina-H ³	
	Cuent./g.	% de Cont.	Cuent./g.	% de Cont.
Control	20.300		608	
3	5.887	29	790	130
6	3.045	15	480	79
24	2.198	11	322	53

Tabla 6.- Efecto " in vivo " de la CHM sobre la incorporación de lisina y uridina. Tras varias horas de tratamiento " in vivo " con 10 µg/ml de CHM, se midió la actividad de incorporación " in vitro " de lisina-H³ y uridina-H³ en glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus*. Los valores de radiactividad ácido-insoluble son comparados con los obtenidos a partir de controles no tratados con la droga.

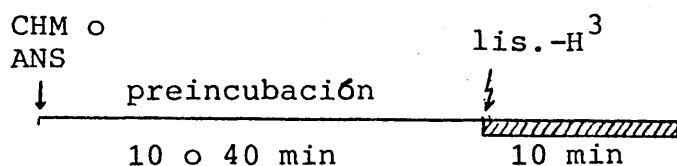
que la dosis de CHM adoptada es considerablemente inhibitoria, " in vivo ", de la síntesis de proteínas en glándulas salivales.

+) A corto tiempo de tratamiento (3 h), la CHM parece provocar un incremento en la radiactividad incorporada en RNA. A tiempos superiores, la incorporación se muestra ya inhibida.

A la vista de estos resultados, se plantearon nuevos experimentos consistentes en la aplicación " in vitro " de inhibidores de la síntesis de proteínas. La técnica " in vitro " hace posibles períodos más cortos de tratamiento, con lo que el incremento transitorio de la radiactividad incorporada en RNA podrá ser mejor caracterizado en sus momentos iniciales. Por otro lado, la aplicación del tratamiento directamente sobre el tejido glandular nos permitirá comprobar si tal fenómeno se debe a una respuesta a nivel celular, y no es mediado por procesos metabólicos ocurrentes en la totalidad del organismo larvario. Por lo demás, en dichos experimentos se utilizará paralelamente CHM y ANS, para asegurarnos en lo posible de que las respuestas observadas del mecanismo de transcripción son una consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, y no debidas fundamentalmente a un efecto secundario de una droga en particular.

2.2. Efecto " in vitro " de la cicloheximida y anisomicina sobre la incorporación de lisina- H^3 .

En orden a adoptar una concentración de ambos inhibidores capaz de producir " in vitro " una depresión efectiva de la síntesis de proteínas, glándulas salivales fueron preincubadas durante 10 y 40 min en medio C.R. conteniendo CHM a concentración de 0,25, 0,5, 1, 2, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, siendo posteriormente marcadas durante 10 min por adición de lisina- H^3 hasta una concentración de 750 $\mu\text{Ci/ml}$, siempre en presencia de la droga. Las proteínas fueron extraídas, y la radiactividad ácido-insoluble de los extractos valorada. Como control, en cada caso las glándulas hermanas de aquellas fueron sometidas al mismo proceso de preincubación y marcado, pero en ausencia de CHM.



Un estudio semejante fue llevado a cabo con ANS, empleando en este caso concentraciones de 2, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de la droga.

Los resultados obtenidos, expresados relativamente a los valores control, se representan gráficamente en la fig.13. Como puede apreciarse (a), una dosis muy baja de CHM (0,25 $\mu\text{g/ml}$) logra ya inhibir considerablemente la incorporación de lisina, inhibición que es prácticamente total a

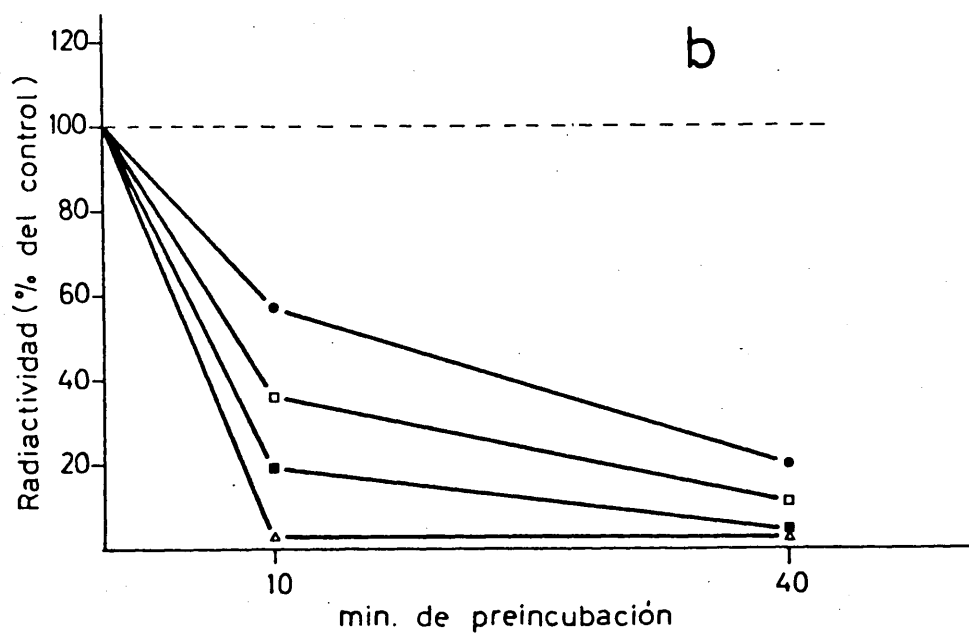
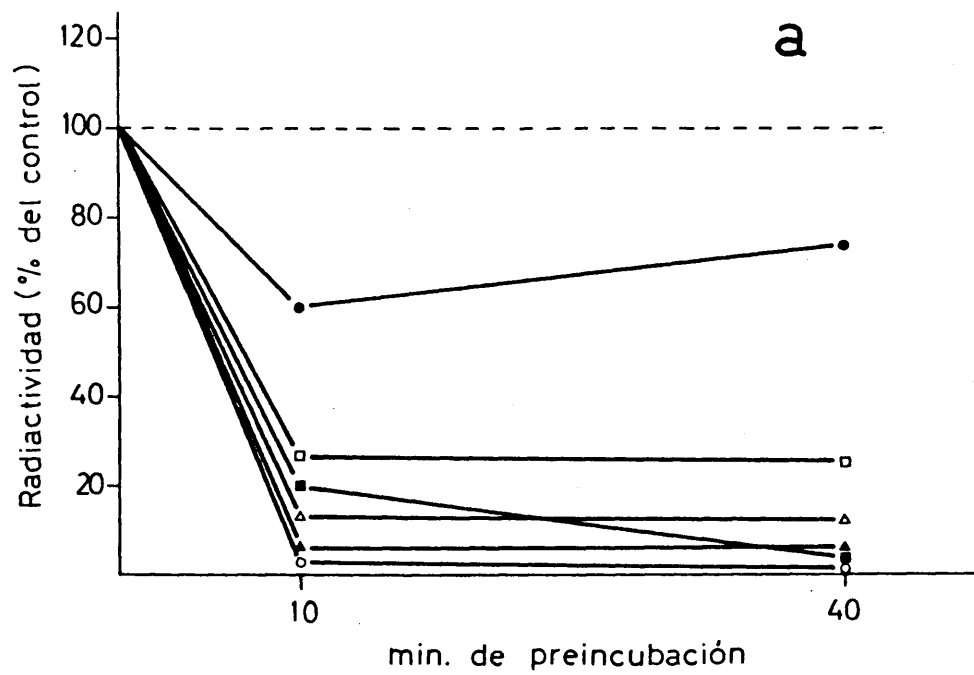
Figura 13.- Efecto " in vitro " de la CHM y ANS sobre la incorporación de lisina. Glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron incubadas " in vitro " con distintas concentraciones de CHM (a) o ANS (b) durante los tiempos indicados en ascisas, y brevemente marcadas con lisina- H^3 . Los valores obtenidos para la radiactividad incorporada son expresados en ordenadas, relativamente al valor del control no tratado.

En a: CHM a concentración :

● ————— ●	0,25 $\mu g/ml$
□ ————— □	0,5 $\mu g/ml$
■ ————— ■	1 $\mu g/ml$
△ ————— △	2 $\mu g/ml$
▲ ————— ▲	5 $\mu g/ml$
○ ————— ○	10 $\mu g/ml$

En b: ANS a concentración :

● ————— ●	2 $\mu g/ml$
□ ————— □	5 $\mu g/ml$
■ ————— ■	10 $\mu g/ml$
△ ————— △	20 $\mu g/ml$



a 10 $\mu\text{g/ml}$. El sistema parece mostrarse menos sensible a la ANS (b), droga de la que se requiere 2 $\mu\text{g/ml}$ para dar lugar a una inhibición parcial, y 20 $\mu\text{g/ml}$ para obtener una depresión prácticamente total.

Las figs. 14 y 15, donde los resultados se representan en función de las concentraciones ensayadas, da una mejor idea de la efectividad de ambos inhibidores. La total semejanza de las curvas a 10 y 40 min de pretratamiento, en el caso de la CHM (fig. 14 a,b), patentiza la rapidez de su acción, incluso a bajas concentraciones, sobre el mecanismo de síntesis de proteínas. Esta acción se muestra menos violenta en el caso de la ANS (fig. 15 a,b), pues sólo a 20 $\mu\text{g/ml}$ se alcanza la inhibición máxima a corto tiempo de pretratamiento (10 min).

Sobre la base de estos resultados se adoptará definitivamente, en los experimentos posteriores " in vitro ", las concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM y 20 $\mu\text{g/ml}$ de ANS, por ser las dosis mínimas que aseguran un máximo de acción depresora de la síntesis de proteínas.

2.3. Efecto " in vitro " de la cicloheximida y anisomicina sobre la incorporación de uridina- H^3 .

Para obtener una primera información acerca de la acción " in vitro " de ambas drogas sobre la actividad de transcripción, glándulas salivales fueron preincubadas en medio de Cannon conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM o 20 $\mu\text{g/ml}$ de ANS, durante 10, 20, 60 y 120 min, siendo después marcadas durante

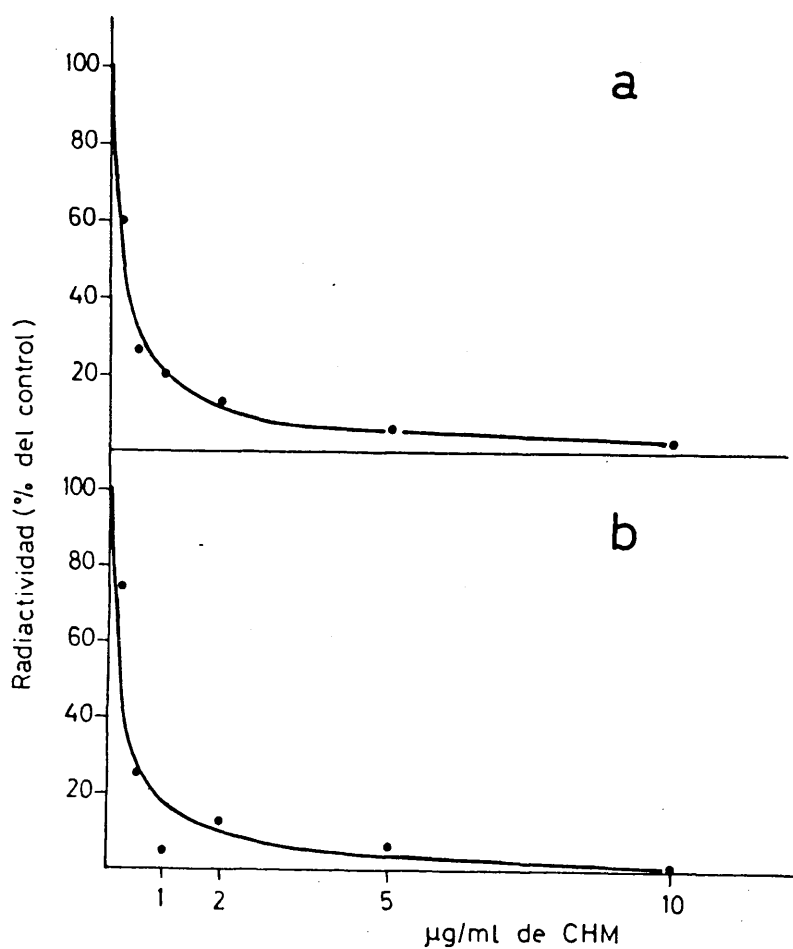


Figura 14.- Efecto " in vitro " de diversas concentraciones de CHM sobre la incorporación de lisina. La tasa de incorporación de lisina- H^3 se representa en ordenadas como tanto por ciento del control, en función de la concentración empleada de CHM.

En a, 10 min de preincubación.

En b, 40 min de preincubación.

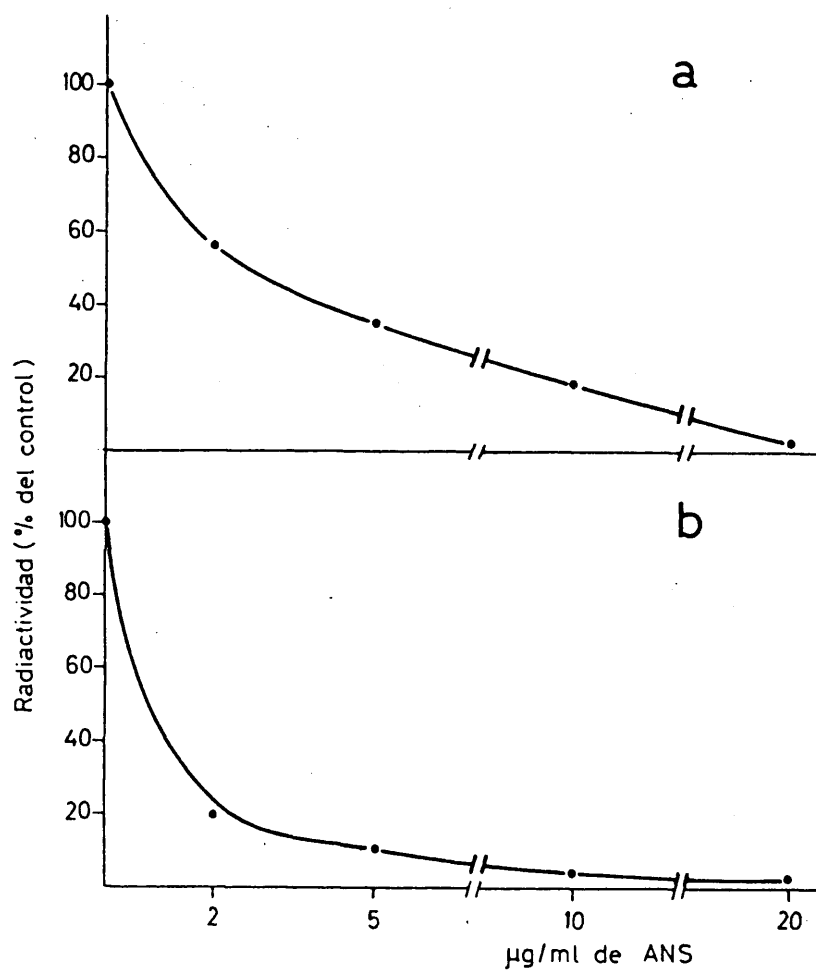


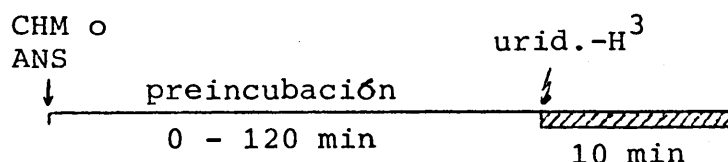
Figura 15.- Efecto " in vitro " de diversas concentraciones de ANS sobre la incorporación de lisina. La tasa de incorporación de lisina- H^3 se representa en ordenadas como tanto por ciento del control, en función de la concentración empleada de ANS.

En a, 10 min de preincubación.

En b, 40 min de preincubación.

10 min por adición de uridina- H^3 hasta una concentración de 650 $\mu\text{Ci/ml}$, siempre en presencia de la droga. Como control, en cada caso las glándulas hermanas de aquellas fueron sometidas a igual proceso de preincubación y marcado, pero en ausencia de la droga. Un experimento adicional fue además realizado sin previa preincubación (es decir, por adición simultánea de la droga y el isótopo: preincubación = 0). Tras el marcado, los ácidos nucleicos fueron extraídos, valorándose la radiactividad ácido-insoluble.

Los experimentos fueron repetidos por triplicado, para cada tiempo de preincubación.



Los resultados obtenidos, expresados relativamente a los valores control, se representan gráficamente en la fig.16. Como puede observarse, dentro del período de tiempo estudiado ambas drogas provocan un incremento en la radiactividad incorporada en RNA. La respuesta inicial parece ser considerablemente más rápida en el caso de la CHM, donde el máximo se alcanza ya prácticamente a los 10 min de pretratamiento. A largo tiempo, sin embargo, ambos inhibidores inducen una tasa de incremento semejante.

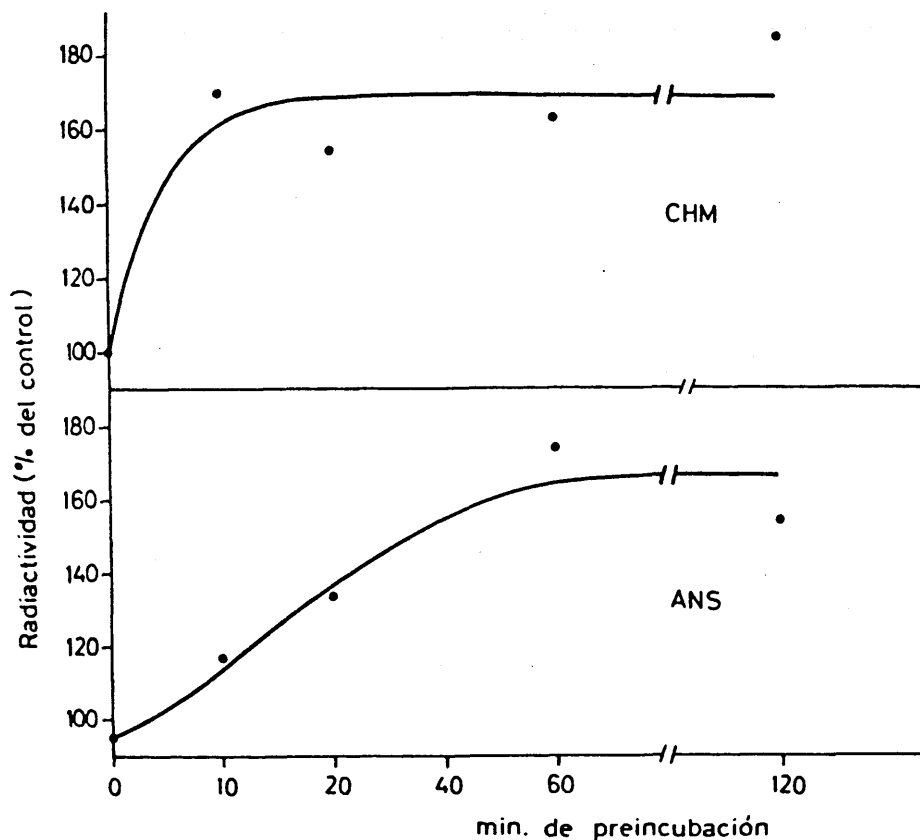


Figura 16.- Efecto " in vitro " de la CHM y ANS sobre la incorporación de uridina. Glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron preincubadas " in vitro " con CHM (10 µg/ml) o ANS (20 µg/ml) durante los tiempos indicados en ascisas, y brevemente marcadas con uridina- H^3 . Los valores obtenidos para la radiactividad incorporada son expresados en ordenadas , como tanto por ciento de los controles no tratados.

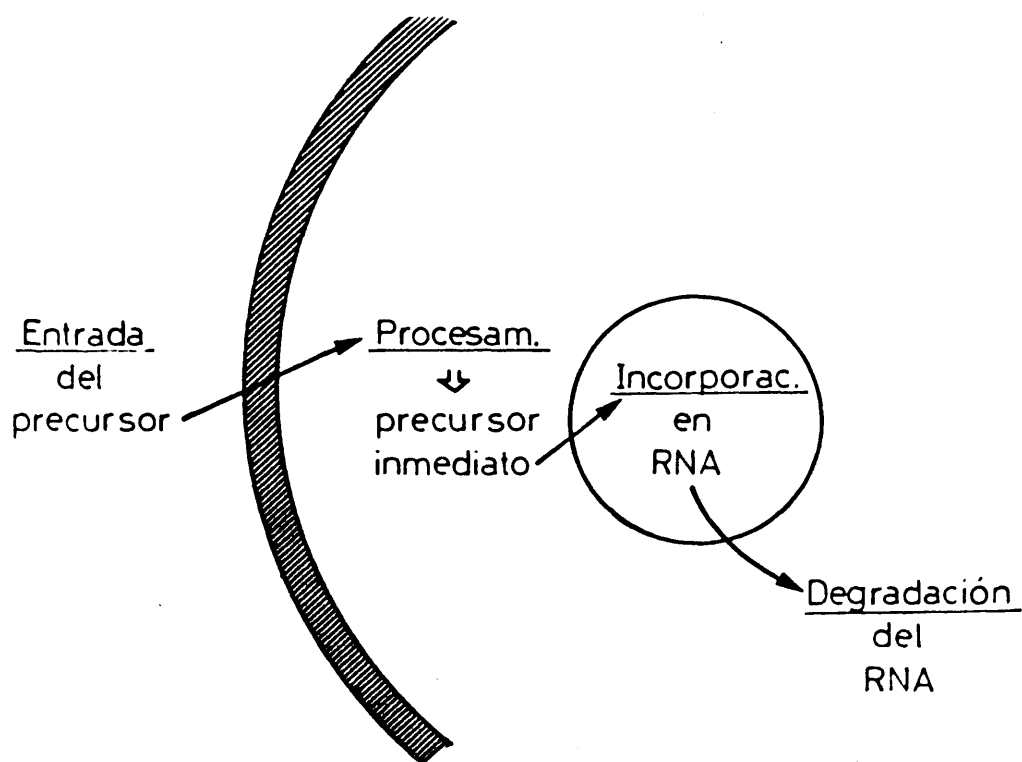
El valor inicial (0) corresponde a un punto donde ningún tiempo de preincubación fue aplicado.

Cada punto representa la media de tres experimentos.

Estos resultados obtenidos " in vitro " confirman lo anteriormente observado " in vivo " (véase tabla 6), en lo referente a una activación de la radiactividad incorporada en RNA como respuesta inicial a la inhibición de la síntesis de proteínas. Aquí se añade una nueva información, referente a la rapidez de respuesta del sistema, pues el incremento en la incorporación de uridina comienza a hacerse patente casi inmediatamente a la aplicación de los inhibidores. Por otro lado, el que tal incremento ocurra también por aplicación " in vitro " de las drogas - es decir, actuando directamente sobre el tejido glandular aislado - nos confirma que la respuesta es un fenómeno a nivel estrictamente celular, y no mediado por procesos previos a nivel de todo el organismo larvario.

2.4. Efecto " in vitro " de la cicloheximida sobre la estabilidad del RNA recién sintetizado.

El problema radica en interpretar tal incremento en la radiactividad incorporada, puesto que no puede, si más, ser directamente atribuido a una mayor actividad de transcripción. En efecto (véase esquema 2), no se puede excluir a priori que un tratamiento sea capaz de activar la entrada o precesamiento intracelular del precursor administrado (uridina- H^3) - lo que provocaría un incremento en la disponibilidad del precursor inmediato marcado, UTP- H^3 -; o de inhibir la tasa de degradación del RNA recién sintetizado - lo



ESQUEMA 2

que redundaría en una mayor acumulación del mismo. Cada una de estas hipótesis podría explicar un incremento en la radiactividad actualmente incorporada en RNA, sin suponer necesariamente un incremento en la actividad de transcripción.

En nuestro caso concreto, es difícil explicar una acumulación importante en la radiactividad incorporada como debida a un cese hipotético de la actividad de degradación, dada la brevedad del pulso de marcado (10 min) y la relativa estabilidad de una buena parte del RNA recién sintetizado (RNA ribosomal y grandes mensajeros específicos). De todos modos, para excluir un efecto en este sentido, un experimento adicional fue llevado a cabo. Glándulas salivales fueron preincubadas durante 10 min en medio de Cannon conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM, siendo entonces marcadas por adición de uridina- H^3 hasta una concentración de 650 $\mu\text{Ci/ml}$, durante 10, 20 o 40 min, siempre en presencia de la droga. Como control, en cada caso las glándulas hermanas de aquellas fueron preincubadas y marcadas durante tiempos iguales, pero en ausencia de la droga. Un experimento adicional fue realizado, sin el período inicial de preincubación (preincubación = 0). En todos los casos, la radiactividad incorporada en RNA fue medida, y los resultados obtenidos representados gráficamente en la fig.17, relativamente a los correspondientes valores control.

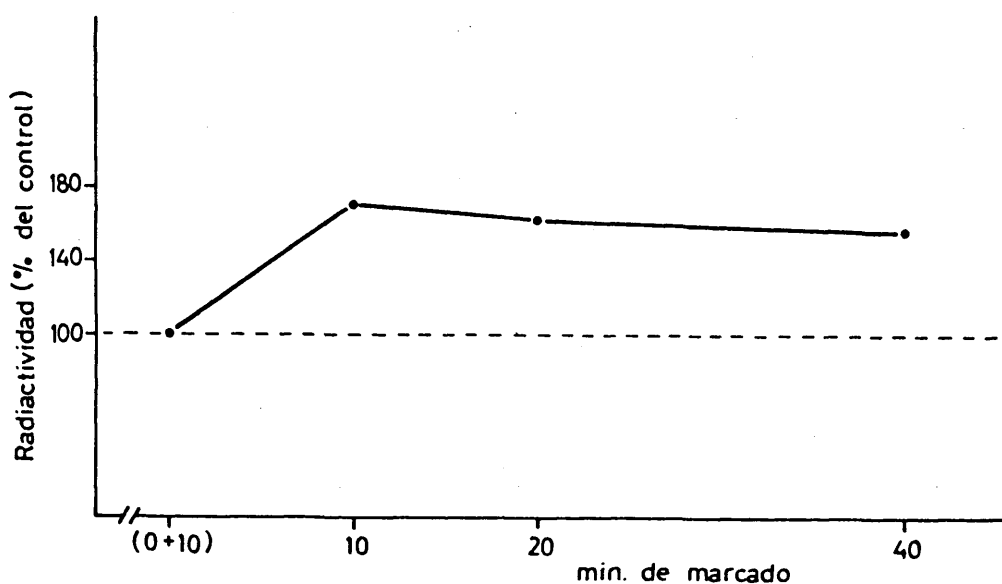
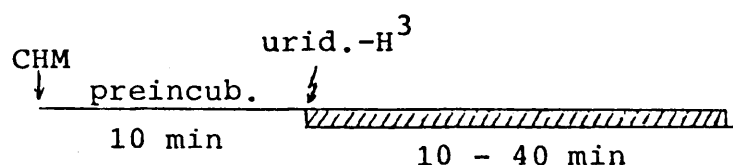


Figura 17.- Efecto " in vitro " de la CHM sobre la estabilidad del RNA recién sintetizado. Tras una breve incubación " in vitro " con CHM, glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron marcadas a diversos tiempos (ascisas) con uridina- H^3 , en presencia de la droga. Los valores obtenidos para la radiactividad incorporada son expresados en ordenadas, relativamente al valor de los controles no tratados.

El valor inicial (0 + 10) corresponde a un punto donde la incubación no fue aplicada.

Cada punto representa la media de tres experimentos.



Los experimentos fueron repetidos por triplicado, para cada tiempo de marcado.

Si la CHM inhibiera la degradación de una parte importante del RNA recién sintetizado, entonces tiempos crecientes de marcado producirían un incremento cada vez mayor de la radiactividad incorporada acumulada en relación al correspondiente control no tratado. Sin embargo, el incremento observado se estabiliza a los 10 min de marcado, lo que excluye la hipótesis de una acumulación de radiactividad incorporada por efecto de no degradación, al menos en el intervalo de tiempo estudiado. Esta conclusión es plenamente acorde a la alcanzada en levaduras por Foury y Goffeau (1973), siguiendo una vía experimental semejante.

3. ESTUDIO SOBRE LA PERMEABILIDAD CELULAR A LA URIDINA.

¿ Podría explicarse el incremento observado en la radiactividad incorporada en RNA por una mayor tasa de captación de uridina- H^3 ?

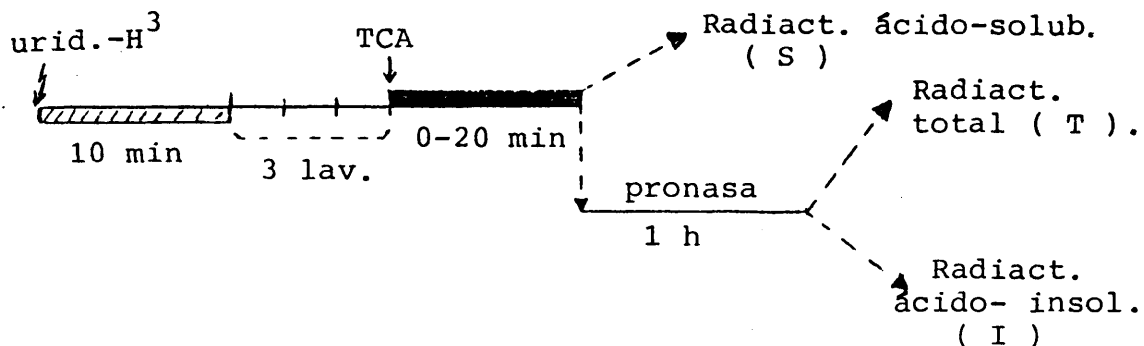
Resultados obtenidos en diversos sistemas biológicos han mostrado que la actividad de captación de un nucleósido es factor limitante de su posterior tasa de incorporación en ácidos nucleicos. Asimismo se ha constatado que dicha actividad de captación puede ser modificada por aplicación de diversas drogas (p.e., DRB^{*}, en fibroblastos: Sehgal et al., 1975; y en células HeLa: Tamm et al., 1976; Sehgal et al., 1976). La CHM, en concreto, parece deprimir en ciertos materiales la tasa de captación de aminoácidos (p.e., en levadura: Grenson et al., 1968; en Neurospora, Wiley y Matchett, 1968; en Penicillium: Hunter et al., 1973), y activar en cambio la incorporación de uridina (en fibroblastos: Hershko et al., 1971). La importancia de este problema es evidente, por cuanto cuestiona seriamente las conclusiones acerca de la actividad de transcripción y sus modificaciones, obtenidas de la simple medición de la radiactividad incorporada. Pese a ello, nunca se había abordado experimentalmente este aspecto en nuestro sistema biológico. Con tal motivo hemos llevado a cabo un estudio en torno a la medida de la captación de uridina, y sus modificaciones por aplicación de CHM, ANS y otros tratamientos, en glándulas salivales de Chironomus.

(*) DRB: 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol: en células de mamíferos es un inhibidor selectivo de la síntesis de hnRNA nuclear.

3.1. Medida de la tasa de captación de uridina.

Tras un período breve de incubación con un nucleósido marcado, el total de radiactividad intracelular está constituido por radiactividad incorporada en ácidos nucleicos (fracción ácido-insoluble), y por radiactividad no incorporada (fracción ácido-soluble). Bajo nuestras condiciones de marcado (10 - 20 min con uridina- H^3), hemos comprobado que el componente ácido-insoluble es insignificante frente a la radiactividad total intracelular (1 - 3 %). Por ello podemos asumir que la valoración de la radiactividad ácido-soluble intracelular es una medida adecuada de la captación, por la célula, del precursor radiactivo durante el período de marcado.

Para comprobar la eficacia del método adoptado de estimación de la radiactividad ácido-soluble, glándulas salivales fueron marcadas durante 10 min en medio de Cannon conteniendo 2.000 $\mu Ci/ml$ de uridina- H^3 , tras lo cual fueron lavadas en el mismo medio y fijadas en TCA, tal como ha sido previamente descrito (Material y Métodos, 4.4.). La radiactividad total presente en los medios de lavado y en el TCA fue valorada, en este último caso a tiempos de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 y 20 min de fijación. Finalmente las glándulas fueron digeridas en medio conteniendo pronasa, midiéndose la radiactividad total y ácido-insoluble en el digesto.



El experimento fue repetido por triplicado. Los resultados obtenidos se resumen en la fig. 18 y en la tabla 7.

La fig.18 expresa gráficamente la media de los valores de radiactividad obtenidos sobre los medios de lavado y de fijación. Dichos valores, previamente reducidos a cuentas por glándula, son expresados relativamente al valor correspondiente a 20 min de fijación. Como puede observarse, la radiactividad residual recogida en los medios de lavado decrece rápidamente. Esto nos confirma que el triple lavado es eficaz para eliminar los restos de uridina- H^3 no captada por la célula, con lo que la radiactividad posteriormente medida en el TCA de fijación será una medida del componente ácido-soluble intracelular extraído, y no debida a contaminantes externos. Por otro lado, la extracción del componente ácido-soluble en presencia de TCA es rápida, alcanzándose ya el máximo a los 4 min de fijación.

La tabla 7 nos da la idea de la eficacia de la extracción del componente radiactivo ácido-soluble en presencia de TCA. El remanente no extraído (T - I) - medido por la diferencia

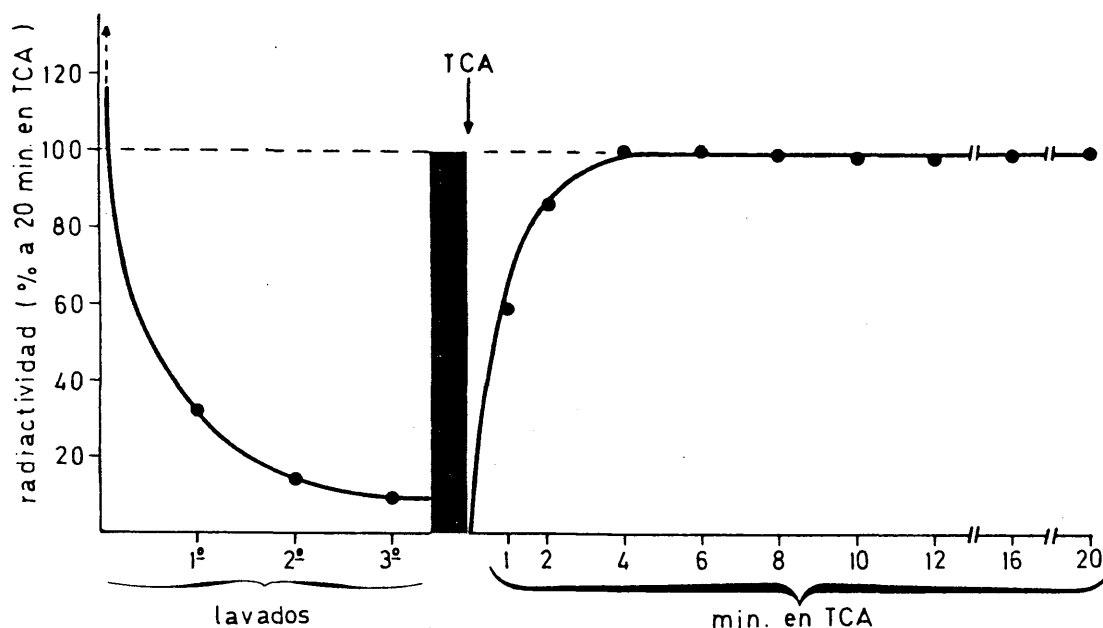


Figura 18.- Medida de la radiactividad ácido-soluble.

Tras un breve marcado " in vitro " con uridina- H^3 , glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron repetidamente lavadas, y finalmente fijadas en TCA. La radiactividad total fue valorada sobre los medios de lavado, y sobre el TCA a tiempos sucesivos (ascisas). Los resultados obtenidos se expresan en ordenadas, relativamente al valor a 20 min de fijación.

Cada punto representa la media de tres experimentos.

experim.	T	I	T - I	S	$\frac{T-I}{S+T-I} \times 100$
1	2.742	2.414	328	110.050	0,30
2	2.470	2.180	290	104.844	0,28
3	1.766	1.464	302	74.300	0.41
Media : 0.33					

Tabla 7.- Medida de la eficacia de la extracción de la

Tabla 7.- Eficacia de la extracción de la radiactividad ácido-soluble en presencia de TCA. Las glándulas marcadas y fijadas con TCA (véase fig.18) fueron digeridas, y los valores de radiactividad total (T) y ácido-insoluble (I) medidos sobre el digesto. La radiactividad ácido-soluble residual (T - I) es calculada y referida como tanto por ciento al total de la misma (es decir, la extraída por el TCA, S, mas la residual: S+T-I).

Los valores son dados como cuentas por glándula.

entre la radiactividad total (T) y ácido-insoluble (I), valorados sobre el digesto de ácidos nucleicos - es comparado con el valor de la radiactividad extraída tras 20 min de fijación en TCA (S). Como puede observarse, dicho remanente no extraído es prácticamente despreciable (un 0,33% del total). Podemos entonces concluir que la fijación con TCA y la valoración de la radiactividad sobre el fijador, es un método adecuado para estimar el componente ácido-soluble radiactivo intracelular y, por ello, la actividad de captación del nucleósido marcado.

3.2. Medida de la captación e incorporación " in vitro " de uridina, en función de su concentración externa.

Para estudiar la modificación de la tasa de captación e incorporación de uridina en función de la concentración administrada del nucleósido, se establecieron parejas de grupos de glándulas hermanas, las cuales fueron preincubadas urante 20 min en medio de Cannon y posteriormente marcadas durante 10 min en el mismo medio por adición de uridina- H^3 . De cada par de grupos hermanos, uno era marcado con 100 $\mu Ci/ml$, siendo usado como control, y el otro lo era a una de las siguientes concentraciones: 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 y 5.000 $\mu Ci/ml$. En cada caso la radiactividad ácido-soluble fue estimada, tras lo cual los ácidos nucleicos fueron extraídos, valorándose la radiactividad incorporada.

Cada punto fue efectuado al menos por duplicado.

Los resultados obtenidos , para la radiactividad ácido-soluble e incorporada , se recogen en la tabla 8, como cuentas por glándula, y en la tabla 9 como índice de incremento relativo al valor correspondiente a 100 $\mu\text{Ci/ml}$. La media de estos índices se representa gráficamente en la fig.19, para las distintas concentraciones ensayadas.

Como puede observarse, el crecimiento de la radiactividad ácido-soluble e incorporada ocurre conforme a curvas paralelas de saturación. Esta conducta, en el caso de la radiactividad ácido-soluble, es plenamente congruente con la idea ya alcanzada en otros sistemas biológicos de que la entrada de uridina se realiza fundamentalmente por mecanismo de transporte activo (p.e., Jacquez, 1962; Plagemann y Roth, 1969; Birch y Turnock, 1976). Por otro lado, el que la radiactividad incorporada siga un comportamiento totalmente paralelo al anterior, apoya la idea ya formulada de que la cuantía del componente soluble - y por ello, la tasa de captación del precursor - es factor limitante de su tasa posterior de incorporación en RNA (p.e., Nakata y Bader, 1969; Plagemann, 1971; Weber y Rubin, 1971; Stambrook et al., 1973).

Por último, es de notar que el estado de saturación en la entrada del precursor parece superarse al aplicar una concentración de 5.000 $\mu\text{Ci/ml}$. Ello podría explicarse considerando

Tabla 8.- Repercusión de la concentración de uridina- H^3 sobre la radiactividad ácido-soluble e incorporada. Grupos de glándulas salivales de Ch. thummi fueron brevemente marcados con diferentes concentraciones de uridina- H^3 , y los grupos de glándulas hermanas, como control, a 100 μ Ci/ml. Los valores obtenidos para la radiactividad ácido-soluble (S) e incorporada (I) son expresados como cuentas por glándula.

Concentrac. comparadas (μ Ci/ml)	1 ^{er} exper.		2 ^o exper.		3 ^{er} exper.	
	S	I	S	I	S	I
100	3.133	79	3.133	259	6.687	257
250	4.987	257	4.227	548	20.400	541
100	19.367	181	19.213	145		
500	68.560	245	52.160	549		
100	12.100	127	6.267	76	13.207	145
1.000	68.473	664	32.080	336	55.627	448
100	24.140	575	19.073	288		
1.500	134.007	2.269	114.267	1.444		
100	34.267	272	12.407	757		
2.000	144.467	2.005	82.367	2.593		
100	35.533	373	20.673	184	17.907	293
2.500	241.487	2.196	86.260	519	72.060	1.497
100	14.467	395	23.333	548		
3.000	68.333	1.303	159.200	3.133		
100	27.420	164	15.060	160		
5.000	223.600	597	189.653	928		

Uridina-H ³ (μ Ci/ml)	1 ^{er} exper.		2 ^o exper.		3 ^{er} exper.	
	S	I	S	I	S	I
250	1,6	2,9	1,7	2,3	3,0	2,1
500	3,4	1,6	2,8	3,8		
1.000	5,6	5,2	5,3	4,4	4,2	4,0
1,500	5,5	3,9	6,5	5,0		
2.000	4,3	7,3	6,6	3,4		
2.500	6,8	6,3	4,2	3,1	4,0	5,1
3.000	4,7	3,3	6,8	5,7		
5.000	8,1	4,2	12,2	5,4		

Tabla 9.- Los valores para la radiactividad soluble (S) e incorporada (I), recogidos en la tabla 8, son aquí expresados como índice de incremento relativo al correspondiente control a 100 μ Ci/ml.

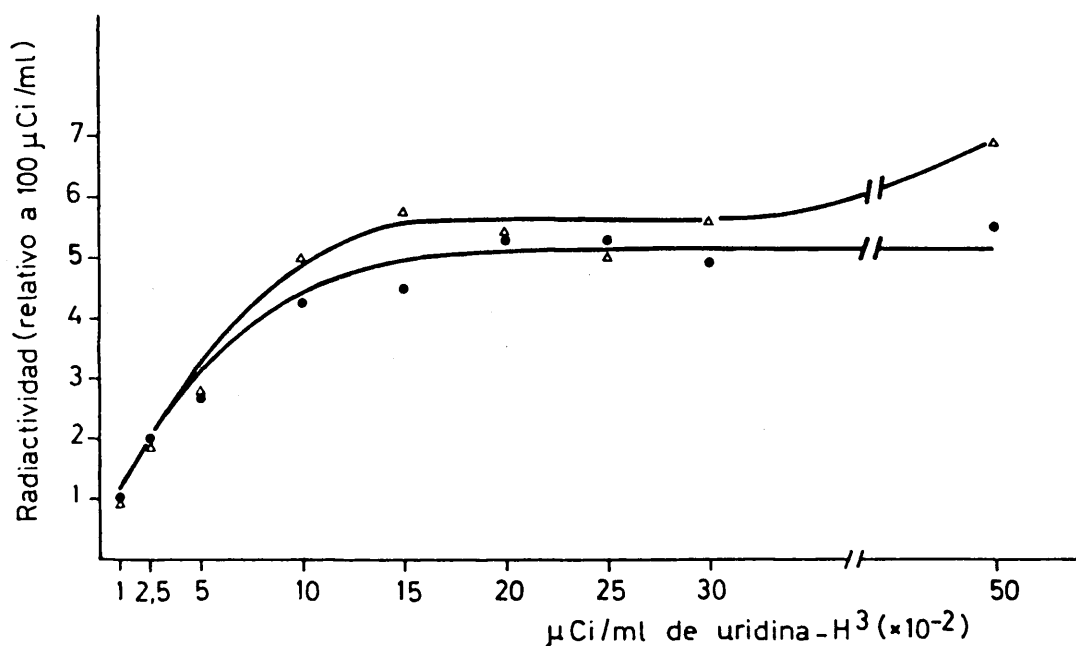


Figura 19.- Modificación de la radiactividad ácido-soluble e incorporada con la concentración de uridina-H³.

Los valores de radiactividad ácido soluble (Δ—Δ) e incorporada (●—●), recogidos en la tabla 8, son aquí representados gráficamente como tanto por ciento del correspondiente control a 100 µCi/ml, en función de la dosis de uridina-H³ empleada.

Cada punto representa la media de los resultados obtenidos con cada dosis ensayada.

que a altas dosis la penetración del nucleósido parece realizarse predominantemente por difusión pasiva, según se ha formulado a partir de los resultados alcanzados en otros sistemas biológicos (p.e., en células de tumor ascítico: Jacquez, 1962; en células de hepatoma Novikoff: Plagemann y Roth, 1969); Plagemann, 1970).

3.3. Efecto " in vitro " de diversos inhibidores sobre la tasa de captación e incorporación de uridina.

El efecto sobre la transcripción de una amplia gama de inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas es bien conocido, siendo en cambio muy escasos los estudios en torno a su posible acción modificadora de la entrada en la célula de diversos precursores. La importancia del tema es manifiesta, pues, como ya se indicó anteriormente, las conclusiones alcanzadas sobre la medida de la radiactividad incorporada pueden verse falseadas si los tratamientos han modificado sensiblemente la tasa de captación de los precursores radiactivos administrados. Con tal motivo, hemos abordado aquí el estudio de las modificaciones en la tasa de captación de uridina en presencia de alguno de los inhibidores de la transcripción (α -amanitina, actinomicina D) o de la síntesis de proteínas (CHM, ANS) utilizados en glándulas salivales.

La CHM y la ANS son inhibidores específicos de la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos, y su modo de acción ha sido ya previamente descrito (Introducción, 2.1.).

La α -amanitina inhibe específicamente la síntesis de RNA extranucleolar en organismos eucarióticos, al actuar directamente sobre la RNA polimerasa II (Seifart y Seckeris, 1969; Seifart, 1970; Jacob et al., 1970; Kedinger et al., 1970; Novello et al., 1970; Chan et al., 1973). En glándulas salivales provoca el colapsamiento e inhibición del marcado autorradiográfico en los anillos de Balbiani (Beermann, 1971; Wobus et al., 1971).

La actinomicina D, a bajas concentraciones, inhibe específicamente la síntesis de RNA nucleolar en células de mamíferos (Perry y Kelly, 1970; Moore y Ringertz, 1973), uniéndose al DNA e impidiendo la polimerización del RNA nascente (Kirk, 1960; Reich y Goldberg, 1964). Su efecto se muestra inespecífico, incluso a bajas concentraciones, en glándulas salivales (Pelling, 1964) causando un colapsamiento de los puffs (Beermann, 1964; Ellgaard y Clever, 1971; Díez, 1973).

Por último, hemos estudiado también la acción del dimetil sulfóxido (DMSO), que a altas concentraciones (10%) parece afectar a la permeabilidad de la membrana celular (Franz y van Bruggen, 1967; Delmer y Mills, 1971), así como al metabolismo de RNA y proteínas (Bajaj et al., 1970) en ciertos sistemas eucarióticos. Recientes observaciones han mostrado que esta droga, a corto tiempo de aplicación " in vivo ", modifica diferencialmente la expansión de los anillos de Balbiani, produciendo a largo tiempo un colapsamiento general-

zados de los mismos (Sass, 1978).

Para llevar a cabo estos experimentos, glándulas salivales fueron incubadas durante 1 h en medio de Cannon, conteniendo una de las siguientes drogas:

- +) 1 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina.
- +) 1 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D.
- +) 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM
- +) 20 $\mu\text{g/ml}$ de ANS
- +) 10% de DMSO.

Las glándulas fueron entonces marcadas durante 10 min. por adición de uridina- H^3 hasta una concentración de 650 $\mu\text{g/ml}$, siempre en presencia de la droga correspondiente, tras lo cual se valoró la radiactividad ácido-soluble e incorporada en RNA.

Como control, en cada caso el grupo correspondiente de glándulas hermanas de aquellas fue sometido a los mismos períodos de preincubación y marcado, pero en ausencia de la droga.

Los experimentos se llevaron a cabo, generalmente, por triplicado.

Los resultados se recogen en la tabla 10, como cuentas por glándula y como índice de modificación en las glándulas tratadas relativo al control. Las medias de estos índices de modificación, expresadas como tanto por ciento, se representan gráficamente en la fig. 20.

Como ya se observó anteriormente (Resultados, 2.3.),

		1 ^{er} exper.		2 ^o exper.		3 ^{er} exper.	
		S	I	S	I	S	I
CHM	C	20.693	708	32.253	972	20.627	399
	Tr	33.620	1.751	56.153	1.395	48.887	1.277
	Tr/C	1,62	2,47	1,74	1,43	2,37	3,26
ANS	C	22.480	815	59.360	1.685	30.780	787
	Tr	45.343	1.673	75.480	2.522	40.680	1.259
	Tr/C	2,02	2,05	1,27	1,50	1,32	1,60
α -amanit.	C	54.247	963	90.167	1.560		
	Tr	82.269	269	124.667	537		
	Tr/C	1,51	0,28	1,38	0,34		
Actinom. D	C	38.667	531	45.667	779	31.493	588
	Tr	40.883	15	42.867	24	39.467	15
	Tr/C	1,06	0,03	0,94	0,03	1,25	0,03
DMSO	C	10.800	171	54.273	684	17.653	185
	Tr	11.626	83	47.580	123	13.000	127
	Tr/C	1,08	0,49	0,88	0,18	0,74	0,69

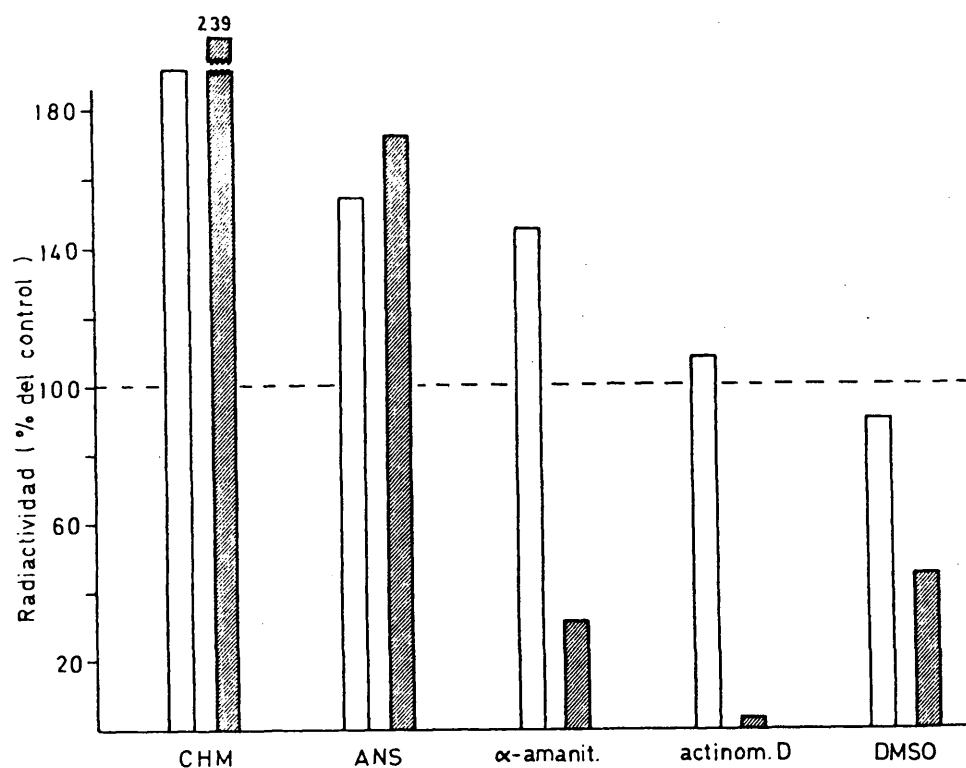
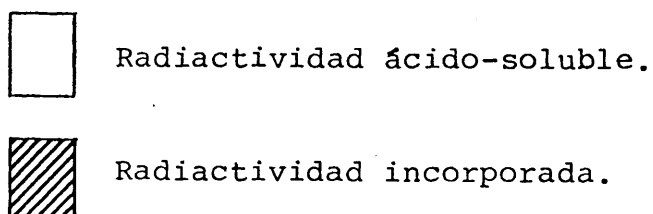


Figura 20.- Modificación de la tasa de captación e incorporación de uridina por aplicación " in vitro " de diversas drogas. La media de los valores de la radiactividad ácido-soluble e incorporada, obtenidos para cada droga (véase tabla 10), se representa aquí como tanto por ciento del correspondiente control no tratado.



la CHM y ANS activan " in vitro " la incorporación de uridina en RNA, pero incrementando también considerablemente su tasa de captación por las células.

La α -amanitina y la actinomicina D inhiben fuertemente, como era de esperar, la radiactividad incorporada en RNA, pero tienden a incrementar, especialmente la α -amanitina, la tasa de captación de uridina.

Por último, el DMSO, bajo las condiciones estudiadas, deprime sólo muy levemente la tasa de captación del precursor, pero inhibe considerablemente su incorporación en RNA.

3.4. Efecto del choque térmico sobre la tasa de captación e incorporación de uridina: relación con el estado de puffing.

La aplicación de modificaciones térmicas en larvas de *Chironomus* ha sido un tratamiento empleado en ocasiones como vía de análisis del mecanismo de puffing y su control (p.e., Beermann, 1952; Ritossa, 1964; Yamamoto, 1970 a,b). Previos estudios realizados en nuestro laboratorio habían mostrado un comportamiento aparentemente antagónico entre el tamaño de ciertos puffs y la tasa de transcripción, medida ésta como incorporación de uridina en el RNA total glandular, durante el período de recuperación subsiguiente a un choque térmico. En concreto, un estado de colapsamiento casi total en el BR2 de *Ch. pallivittatus* parecía coexistir con una no modificación o incluso ligero incremento en la síntesis global de RNA.

Para investigar más detalladamente esta aparente discrepancia, se llevó a cabo un estudio autorradiográfico. Larvas aproximadamente iguales de un mismo cultivo de *Ch. pallidivittatus* fueron sometidas a una temperatura de 39°C durante 5 min, tras lo cual fueron mantenidas en recuperación en su propio medio de cultivo, a 18°C. A las horas 1 y 8, algunas larvas fueron sacrificadas, y sus glándulas salivales procesadas para autorradiografía, conforme a la técnica previamente descrita (Material y Métodos, 3.2.). Se efectuaron también preparaciones autorradiográficas con glándulas de larvas no sometidas al choque, siendo utilizadas como control.

Para estimar las modificaciones producidas por el tratamiento, los BR2 fueron agrupados en 3 clases según tamaño, siguiendo este criterio: (ejemplificado en fig.21).

Clase A: diámetro del anillo igual o mayor al doble del grosor del cromosoma (en zona no de puff).

Clase B: diámetro del anillo menor del doble del grosor del cromosoma, pero suficientemente apreciable.

Clase C: anillo prácticamente colapsado.

Del mismo modo, según la intensidad de marcado, los anillos fueron agrupados en 4 clases:

+++ : marcado muy denso: los granos dan lugar a una mancha continua.

++ : marcado bastante denso, aunque los granos aparecen individualizados.

Figura 21.- Clases, según tamaño, del BR2 en Ch. palli-
divittatus.

En a, anillo grande (clase A).

En b, anillo pequeño (clase B).

En c, anillo casi colapsado (clase C).

En d, anillo hipertrofiado (clase A).



b



c



d

+ : marcado poco denso.

- : marcado no superior al fondo citoplásmico.

Los valores de cada clase, tanto para tamaños como para intensidad de marcado, se recogen en la tabla 11 expresados como tanto por ciento del total de anillos medidos a cada tiempo.

Como puede observarse, 1 h después del choque hay un considerable efecto de reducción en el tamaño del anillo - manifestado especialmente por el incremento en las formas colapsadas (clase C) - así como en la tasa de marcado autorradio-gráfico. Lo más destacable es, sin embargo, lo observado a la hora 8 : frente a una total recuperación en el tamaño del anillo, incluso mostrando formas frecuentemente hipertrofiadas (ver ejemplo en fig. 21 d), su intensidad de marcado es aún muy inferior a los controles.. Esta disparidad se observa más claramente en la fig.22, donde, para mayor simplicidad, la intensidad de marcado ha sido reducida solamente a dos clases.

Un ejemplo fotográfico se presenta en la fig.23. Obsérvese que el tamaño del BR2 es semejante a la hora 8 (c) y en el control (a), siendo en cambio muy distinta la intensidad de marcado.

Como ya se indicó (Introducción, 1.3.), se admite comúnmente una relación entre el tamaño de un puff y la actividad de transcripción del locus o loci implicados en el mismo

Horas de recuperac.	Tamaño			Marcado			
	A	B	C	+++	++	+	-
Control	66	28	4	75	19	3	1
1	-	10	90	-	9	22	69
8	74	24	-	15	20	48	16

Tabla 11.- Modificación del tamaño e intensidad de marcado en anillos de Balbiani por efecto del choque térmico. A distintas horas de recuperación tras un choque térmico (39°C, 5 min), glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron procesadas para autorradiografía, y los BR2 agrupados en distintas clases según tamaño e intensidad de marcado (véanse en el texto los criterios de clasificación). El control corresponde a glándulas de larvas no sometidas a choque. Los valores vienen dados como tanto por ciento del total de anillos medidos a la hora indicada.

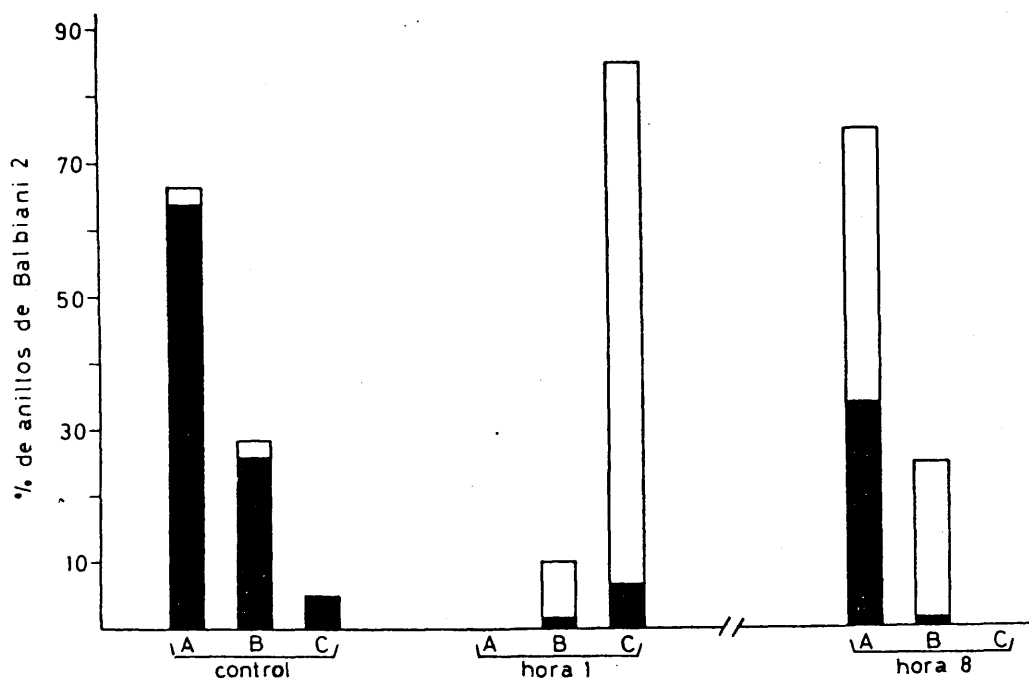


Figura 22.- Efecto del choque térmico sobre el tamaño e intensidad de marcado autorradiográfico en los anillos de Balbiani 2. Para cada tiempo de recuperación tras un choque térmico (39°C, 5 min), el tanto por ciento de anillos correspondientes a cada clase de tamaño (véase tabla 11) es gráficamente expresado por la altura de la columna, y dentro de ésta lo es la intensidad de marcado autorradiográfico, conforme a dos grados:



marcado muy intenso.



marcado poco intenso.

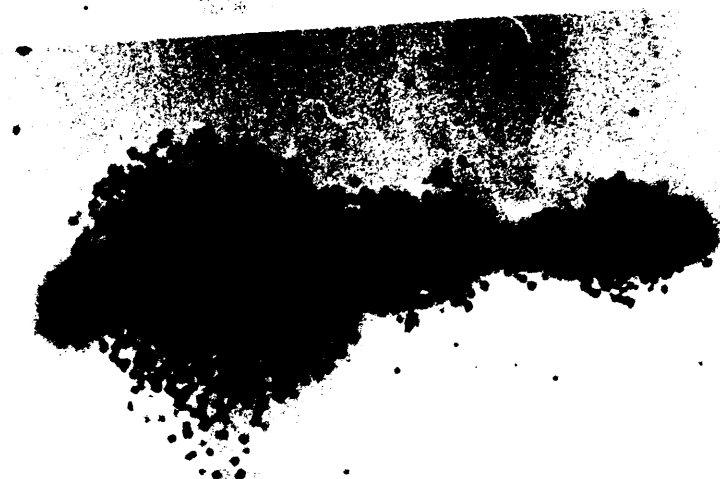
Figura 23.- Variación del tamaño e intensidad de marcado autorradiográfico en el cromosoma IV de Ch. pallidivittatus, por efecto de un choque térmico. En a, control; en b y c, horas 1 y 8 de recuperación, respectivamente, tras el choque (39°C, 5 min). Nótese que a hora 8 el BR2 presenta un tamaño semejante, pero un marcado mucho menor, que en el control.



a



b



c

(Pelling, 1964). Esta hipótesis aparecería seriamente cuestionada por nuestros resultados, de admitirse que la intensidad de marcado autorradiográfico nos da una medida directa de la actividad de transcripción. Sin embargo, podría formularse una hipótesis conciliadora, consistente en que el choque térmico hubiera modificado fuertemente la captación de uridina- H^3 y, consiguientemente, su tasa de incorporación en RNA.

Para comprobar esta posibilidad, se efectuó un choque térmico en las condiciones anteriormente descritas. A las horas 1 y 8 de recuperación, se sacrificaron larvas, y sus glándulas fueron marcadas durante 10 min en medio de Cannon conteniendo 2.000 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 , tras lo cual se valoró la radiactividad ácido-soluble. Como control, igual proceso experimental se llevó a cabo con glándulas de larvas no sometidas al choque térmico.

El experimento fue llevado a cabo por duplicado.

De la observación de la tabla 12, donde los resultados han sido recogidas como cuentas por glándula y relativamente al control, se deduce que la tasa de captación de uridina- H^3 se ve considerablemente incrementada a la hora 1, y muy disminuida, en cambio, a la hora 8 de recuperación tras el choque térmico. Esta disminución a hora tardía puede explicar, al menos en parte, la considerable bajada del marcado autorradiográfico y, por ello, la discrepancia entre el tamaño del anillo y la actividad de incorporación del isótopo a nivel local.

Experimento		cuentas/g	% del Control	Media
Cont.	1	92.336		
	2	97.096		
hora 1	1	188.123	204	179
	2	149.803	154	
hora 8	1	48.133	52	63
	2	70.407	73	

Tabla 12.- Efecto de un choque térmico sobre la tasa de captación de uridina. A distintas horas de recuperación tras un choque térmico (39°C, 5 min), la tasa de captación de uridina fue medida, como radiactividad ácido-soluble, en glándulas salivales de Ch. thummi. Los resultados se expresan como cuentas por glándula, y relativamente al correspondiente control no tratado.

3.5. Efecto de la cicloheximida y anisomicina sobre la tasa de captación de uridina.

Los primeros resultados mostraban que la CHM y ANS, bajo condiciones de aplicación " in vitro ", parecen inducir una clara activación en la tasa de captación de uridina- H^3 (Resultados, 3.3.). Dada la importancia de este problema en el contexto del trabajo presente, se llevó a cabo un estudio más completo sobre el efecto de ambos inhibidores , bajo distintas condiciones de aplicación, sobre la captación de dicho nucleósido.

Glándulas salivales fueron tratadas " in vitro " en medio de Cannon conteniendo 10 $\mu g/ml$ de CHM o 20 $\mu g/ml$ de ANS, durante 20, 60, 120 y 180 min, y marcadas posteriormente durante 10 min por adición de uridina- H^3 hasta una concentración de 2.000 $\mu Ci/ml$, en presencia de la droga. Tras ello, se valoró la radiactividad ácido-soluble intracelular. Como control, en cada caso las glándulas hermanas de aquellas fueron sometidas a iguales períodos de pretratamiento y marcado, pero en ausencia de la droga.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 13 , para el caso de la CHM, y en la tabla 14, para la ANS, expresados como cuentas por glándula y como índice de modificación relativo al control. Los valores medios de estos índices para cada tiempo de preincubación se representan gráficamente, como tanto por ciento, en la fig 24 a,b.

Tabla 13.- Efecto " in vitro " de la CHM sobre la
tasa de captación de uridina. Tras ser preincubadas a distintos tiempos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM, y brevemente marcadas con uridina- H^3 , la radiactividad ácido-soluble fue medida en glándulas salivales de Ch. thummi. Como control se emplearon las glándulas hermanas no tratadas con la droga. C, control; Tr, tratadas. Los resultados se expresan como cuentas por glándula, y como índice de modificación relativo al control (Tr/C).

Experimento		min. de preincubación			
		20	60	120	180
1	C	146.733	83.187	64.513	107.673
	Tr	139.793	141.460	200.033	128.140
	Tr/C	0,95	1,7	3,1	1,19
2	C	77.973	95.347	159.627	129.633
	Tr	99.067	118.887	145.580	215.687
	Tr/C	1,27	1,24	0,91	1,66
3	C	97.286	37.133		157.033
	Tr	151.387	41.387		179.373
	Tr/C	1,55	1,11		1,14
4	C		212.905		49.244
	Tr		191.908		162.667
	Tr/C		0,9		3,3
5	C		92.010		116.738
	Tr		121.667		148.257
	Tr/C		1,32		1,27
6	C		90.072		132.709
	Tr		151.766		150.709
	Tr/C		1,68		1,14

Tabla 14.- Efecto " in vitro " de la ANS sobre la
tasa de captación de uridina. Tras ser preincubadas
a distintos tiempos con 20 $\mu\text{g/ml}$ de ANS, y brevemente
marcadas con uridina- H^3 , la radiactividad
ácido-soluble fue medida en glándulas salivales
de Ch. thummi. Como control se emplearon las glándulas
hermanas no tratadas con la droga. C, control;
Tr, tratadas. Los resultados se expresan como
cuentas por glándula, y como índice de modificación
relativo al control.

Experimento		min. de preincubación			
		20	60	120	180
1	C	154.093	110.007	80.373	115.660
	Tr	217.087	108.080	161.167	138.080
	Tr/C	1,4	0,98	2,0	1,19
2	C	177.847	218.882	65.853	59.787
	Tr	193.900	194.637	71.080	94.307
	Tr/C	1,09	0.89	1,05	1,57
3	C	74.287	158.265	29.833	61.522
	Tr	156.953	244.453	80.160	133.060
	Tr/C	2,11	1,54	2,68	2,16
4	C		78.807		66.572
	Tr		141.588		136.773
	Tr/C		1,80		2,05

Una segunda serie de experimentos fue llevada a cabo para estimar el efecto " in vivo" de ambos inhibidores. Larvas aproximadamente iguales de un mismo cultivo fueron incubadas en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM o 50 $\mu\text{g/ml}$ de ANS. A las horas 1, 3, 6 y 24 de tratamiento, se sacrificaron varias larvas, siendo marcadas sus glándulas durante 10 min. con 750 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 en medio C.R. Tras ello se valoró la radiactividad ácido-soluble intracelular. Como control se utilizaron larvas no tratadas con la droga.

Los resultados obtenidos, expresados como cuentas por glándula, se recogen en la tabla 15 para el caso de la CHM, y en la tabla 16 para el caso de la ANS. El valor medio para cada tiempo de tratamiento, expresado relativamente al control, se representa en la fig.24 c,d.

Como puede observarse, el efecto de la CHM y ANS sobre la actividad de captación de uridina es considerablemente distinto según los inhibidores sean aplicados " in vivo" o " in vitro ". Por otro lado, para las mismas condiciones de aplicación, ambos inhibidores producen un efecto muy similar. Bajo condiciones " in vitro ". la tasa de captación de uridina resulta activada a todos los tiempos de preincubación ensayados, pero especialmente a los más tardíos (120 y 180 min). Por el contrario, el tratamiento " in vivo " durante el mismo intervalo de tiempo (hasta 3 h) no parece producir modificaciones de importancia. (las pequeñas variaciones no pueden

Experimento	Control	horas de tratamiento			
		1	3	6	24
1	51.600	77.300	62.925	64.561	24.205
2	84.175	71.725	71.650	52.447	37.630
3	80.300	48.675	59.200	62.750	35.804
4	60.550	87.850	83.975	41.874	11.646
5	69.225		105.625		
6	109.625				
Media	75.912	71.387	76.750	55.408	27.321
Relat. al Control		0,94	1,01	0,73	0,36

Tabla 15.- Efecto " in vivo " de la CHM sobre la tasa de captación de uridina. Tras un tratamiento " in vivo " a distintos tiempos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM, y un breve marcado " in vitro " con uridina- H^3 , la radiactividad ácido-soluble fue medida en glándulas salivales de *Ch. thummi*. Como control se utilizaron larvas no tratadas con la droga. Los resultados se expresan como cuentas por glándula, y relativamente al control.

Experimento	Control	horas de tratamiento			
		1	3	6	24
1	76.810	64.210	72.925	44.990	43.140
2	67.600	74.185	87.650	53.405	27.650
3	82.090	65.585	62.180		
Media	75.500	67.993	74.252	49.197	36.073
Relativo al Control		0,90	0,98	0,65	0,48

Tabla 16.- Efecto " in vivo " de la ANS sobre la tasa de captación de uridina. Tras un tratamiento " in vivo " a distintos tiempos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ANS, y un breve marcado " in vitro " con uridina- H^3 , la radiactividad ácido-soluble fue medida en glándulas salivales de *Ch. thummi*. Como control se utilizaron larvas no tratadas con la droga. Los resultados se expresan como cuentas por glándula y relativamente al control.

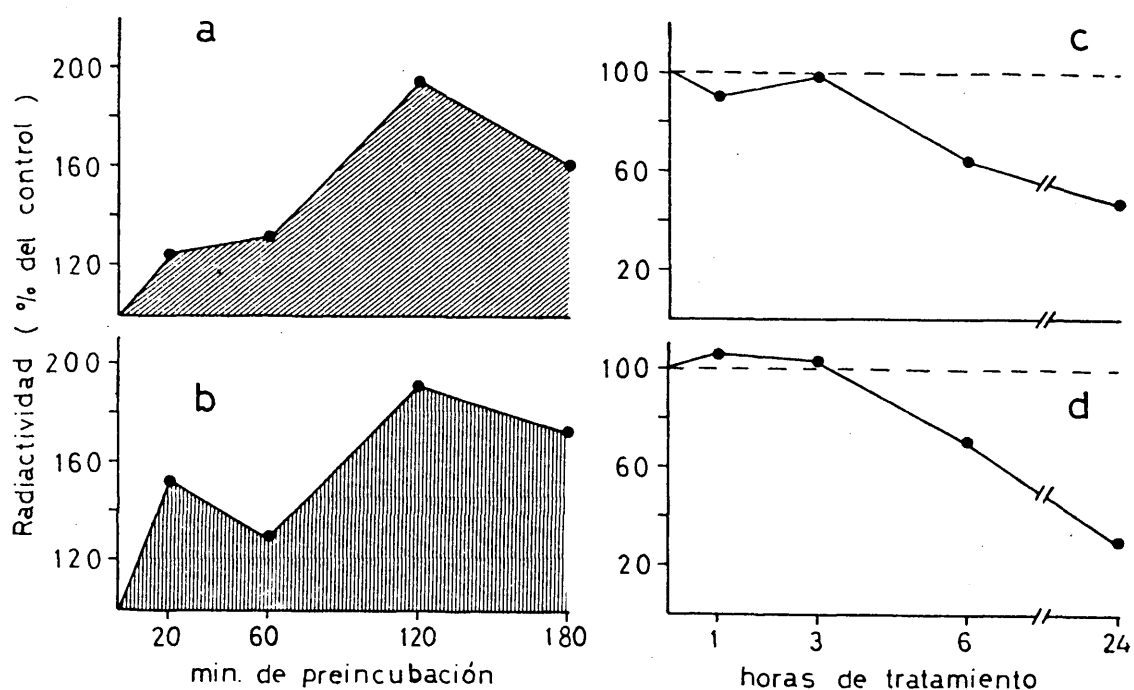


Figura 24.- Modificación de la tasa de captación de uridina por aplicación de CHM y ANS. Para cada tiempo de tratamiento, la media de los valores de radiactividad ácido-soluble (véase tablas 13, 14, 15, 16) se representa aquí gráficamente como tanto por ciento del correspondiente control no tratado. En a, CHM " in vitro "; en b, ANS " in vitro "; en c, CHM " in vivo "; en d, ANS " in vivo ".

El área rayada denota la activación resultante.

considerarse significativas, dada la variabilidad inherente al uso de larvas distintas: véase resultados 1.5.). A tiempos superiores de tratamiento (horas 6 y 24), la tasa de captación resulta ya claramente deprimida.

Estos resultados reafirman la pregunta, ya antes planteada, de si el efecto de activación observado previamente en la radiactividad incorporada en RNA (véase Resultados, 2.3., fig.16), por aplicación " in vitro " de CHM y ANS, no podría ser adecuadamente explicado por el incremento producido en la captación de uridina- H^3 . Tal cuestión nos plantea la necesidad de elaborar y aplicar coeficientes de corrección, que permitan estimar la modificación en la tasa de incorporación del nucleósido en RNA, libre del influjo de las posibles alteraciones en su tasa de captación. Se hablará entonces de " incorporación corregida ", cuando dichos coeficientes de incorporación hayan sido aplicados.

3.6. Determinación de la radiactividad incorporada " corregida ".

El problema a la hora de elaborar un coeficiente de corrección consiste en saber en qué grado una modificación en la tasa de captación del precursor repercute posteriormente en su tasa de incorporación. A este respecto, algunos autores han adoptado sin más el principio de una relación lineal (Tamm et al., 1976; Sehgal et al., 1976): es decir, un incremento dado en la radiactividad ácido-soluble determinará un incremento igual de la radiactividad incorporada.

Para obtener alguna indicación sobre este problema, fueron reconsiderados los resultados obtenidos en un experimento anterior, donde la radiactividad ácido-soluble e incorporada habían sido medidas en función de la dosis administrada de uridina- H^3 (véanse Resultados, 3.2.). En este caso, para cada concentración del isótopo (i), se determinó el cociente entre la radiactividad incorporada (I) y ácido-soluble (S); a saber:

$$(I / S)_i$$

lo cual nos mide la " tasa de aprovechamiento ", es decir, la fracción de radiactividad captada que ha sido incorporada en RNA, para dicha concentración i ensayada. Los cocientes así obtenidos fueron referidos a su correspondiente control a 100 $\mu\text{Ci/ml}$, obteniéndose las relaciones:

$$\frac{(I / S)_i}{(I / S)_{100}}$$

lo cual nos mide la tasa de aprovechamiento, relativa a la concentración mínima, 100 $\mu\text{Ci/ml}$. El valor medio de estas relaciones se representa gráficamente, en función de la dosis i , en la fig.25.

Si un incremento en la radiactividad ácido-soluble determinara siempre un incremento igual en la radiactividad incorporada (relación lineal), entonces se daría siempre que:

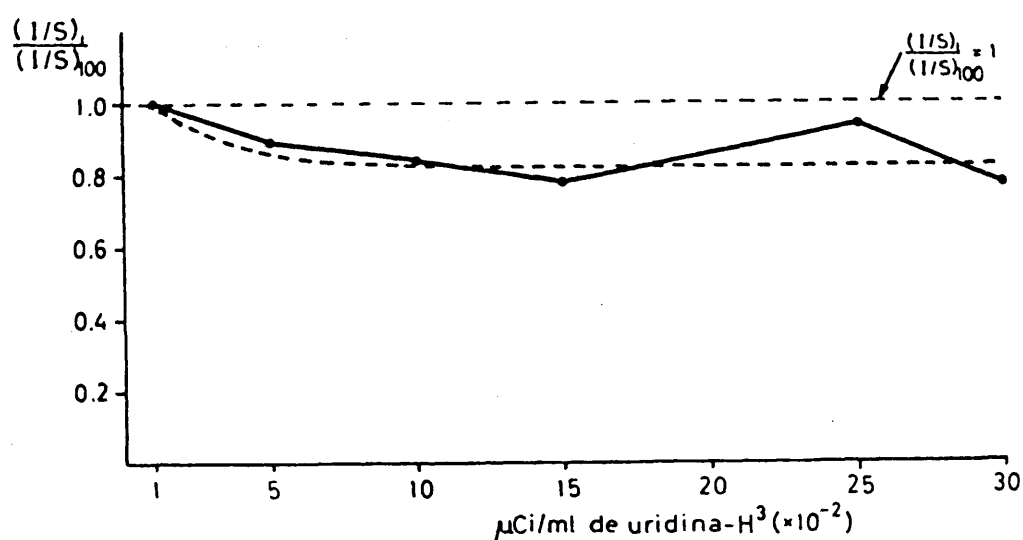


Figura 25.- Variación de la tasa de aprovechamiento de la radiactividad ácido-soluble. Para cada concentración de uridina-H³ administrada (i , en ascisas), la fracción de radiactividad captada que es incorporada en RNA $\left[(I/S)_i \right]$ es expresada relativamente al valor de dicha fracción a 100 $\mu\text{Ci/ml}$ $\left[(I/S)_{100} \right]$, en ordenadas.

En $\bullet \text{---} \bullet$, curva real obtenida.

En $- - - -$, aproximación teórica.

$$\frac{(I / S)_i}{(I / S)_{100}} = 1$$

con lo cual el resultado sería una recta paralela al eje de ascisas. Sin embargo, de la observación de la gráfica obtenida, se deduce que:

+) La relación es siempre inferior a la unidad: Esto indica que en ningún caso el incremento de la concentración administrada del precursor determinará una mayor tasa de aprovechamiento respecto a la concentración más baja, sino todo lo contrario.

+) La tasa de aprovechamiento sufre una disminución inicial, hasta una concentración de aproximadamente 1.000 $\mu\text{Ci/ml}$, para aparentemente estabilizarse a concentraciones superiores. Es decir, que:

$$\frac{(I / S)_i}{(I / S)_{100}} \text{ es constante, para } i \text{ comprendido entre } 1.000 \text{ y } 3.000 \mu\text{Ci/ml.}$$

Con lo cual podremos fundadamente adoptar un criterio de relación lineal de incrementos entre la radiactividad ácido-soluble e incorporada cuando trabajemos dentro de ese intervalo de concentraciones.

Este aparente mantenimiento de la tasa de aprovechamiento del precursor, dentro de dicho intervalo de concentraciones, parece confirmarse por los resultados recientemente obtenidos en nuestro laboratorio, comparando entre sí otras concentracio-

nes de uridina- H^3 distintas a las aquí utilizadas.

¿ Supuestas tales premisas, cómo elaborar el coeficiente de corrección ?.

Sea un experimento en el que el efecto de un tratamiento es comparado con el control no tratado, y los resultados obtenidos:

- +) Control, radiactividad ácido-soluble : S_c
- +) Control, radiactividad incorporada : I_c
- +) Tratado, radiactividad ácido-soluble : S_{tr} .
- +) Tratado, radiactividad incorporada : I_{tr}

El coeficiente de corrección lineal vendrá dado entonces por:

$$S_c / S_{tr}.$$

Entonces, el producto:

$$\frac{S_c}{S_{tr}} \cdot \frac{I_{tr}}{I_c}$$

nos dará el índice de incremento en la radiactividad incorporada " corregida ", expresado relativamente al control no tratado.

4. EFECTO " IN VITRO " DE LA CICLOHEXIMIDA Y ANISOMICINA SOBRE LA SINTESIS DE RNA.

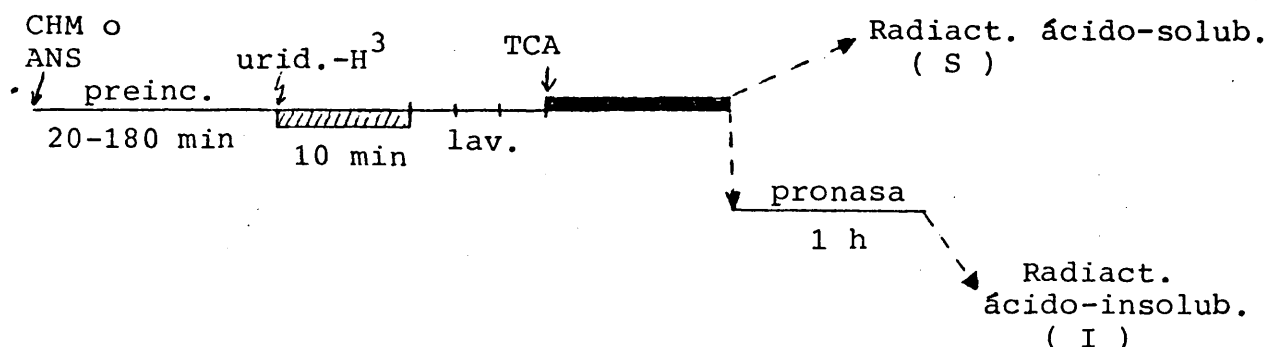
Por lo expuesto se deduce claramente que el incremento observado en la radiactividad incorporada en RNA, al menos por el tratamiento " in vitro " con CHM y ANS, no puede ser sin más atribuido a una mayor actividad de transcripción. La pregunta que que ahora se plantea es si el incremento en la tasa de captación de uridina- H^3 , por efecto de ambas drogas, puede explicar totalmente, o no, su mayor actividad de incorporación en RNA.

Para responder a esta cuestión , en todos los experimentos posteriores se medirá la radiactividad ácido-soluble, calculando y aplicando coeficientes de corrección en orden a poder obtener los valores de la radiactividad incorporada " corregida ". Por otro lado, se utilizará una concentración elevada de uridina- H^3 - 2.000 μ Ci/ml - que, por lo anteriormente visto (Resultados, 3.6.), resulta adecuada para el empleo de coeficientes de corrección lineal.

4.1. Modificación de la radiactividad incorporada " corregida ".

En un experimento anterior, la radiactividad ácido-soluble había sido estimada tras una preincubación de las glándulas " in vitro " a tiempos variables con CHM o ANS, y un breve marcado con uridina- H^3 a 2.000 μ Ci/ml (véase Resultados, 3.5.). El proceso fue ahora completado mediante extracción de los ácidos nucleicos, y valoración de la radiactividad in-

corporada.



Para el caso de la CHM, los valores de radiactividad ácido soluble e incorporada se recogen conjuntamente en la tabla 17 como cuentas por glándula, y en la tabla 18 como índices de modificación relativos al control. En este último caso, el cociente I/S representará entonces el índice de incremento de la radiactividad incorporada " corregida ". La media de estos resultados, como tanto por ciento del control, se representa gráficamente en la fig.26. Como puede observarse, la radiactividad incorporada experimenta por lo general un incremento superior a la radiactividad ácido-soluble. Por tal causa, la tasa de incorporación " corregida " se ve también significativamente activada, salvo a corto tiempo de tratamiento (fig.26b).

Para el caso de la ANS, los valores obtenidos se recogen en las tablas 19 y 20, como cuentas por glándula y como índices de modificación relativos al control, respectivamente; y, gráficamente, en la fig.27. También en este caso la radiactividad incorporada " corregida " se ve significativamente incre-

Experimento	20		60		120		180	
	S	I	S	I	S	I	S	I
1 C	146.733	1.609	83.187	1.095	64.513	1.284	107.673	1.781
Tr	139.793	1.453	141.460	1.425	200.033	4.969	128.140	3.304
2 C	77.793	687	95.347	916	159.627	3.367	129.633	2.888
Tr	99.067	976	118.887	1.229	145.580	4.515	215.687	3.912
3 C	97.286	1.375	37.133	541			157.033	2.760
Tr	151.387	1.655	41.387	1.375			179.373	4.355
4 C			212.905	4.112			49.244	1.084
Tr			191.908	4.824			162.667	2.536
5 C			92.010	1.556			116.738	1.508
Tr			121.667	2.740			148.257	2.320
6 C			90.072	2.396			132.709	2.168
Tr			151.766	4.496			150.709	2.572

Tabla 17.- Modificación de la radiactividad ácido-soluble e incorporada por aplicación " in vitro " de CHM. Tras un tiempo variable de preincubación " in vitro " con 10 µg/ml de CHM, y un breve marcado con uridina- H^3 , se midió la radiactividad ácido-soluble (S) e incorporada (I) en glándulas salivales de Ch. thummi. Como control se emplearon las glándulas hermanas no tratadas con la droga. C, control; Tr, tratadas. Los valores corresponden a cuentas por glándula.

minutos de preincubación

Experimento	20						60						120						180					
	S		I		I/S		S		I		I/S		S		I		I/S		S		I		I/S	
1	0,95	0,90			0,95		1,70	1,30			0,76		3,10	3,87			1,25		1,19	1,85			1,55	
2	1,27	1,42			1,12		1,24	1,30			1,05		0,91	1,34			1,47		1,66	1,35			0,81	
3	1,55	1,20			0,77		1,11	2,54			2,29								1,14	1,58			1,38	
4							0,90	1,17			1,30								3,30	2,34			0,71	
5							1,32	1,76			1,33								1,27	1,54			1,21	
6							1,68	1,88			1,12								1,14	1,19			1,04	

Tabla 18.- Modificación de la tasa de captación e incorporación de uridina, por aplicación " in vitro " de CHM. Los valores correspondientes a la radiactividad ácido-soluble (S) e incorporada (I) , recogidos en la tabla 17, son aquí expresados como índice de modificación en las glándulas tratadas respecto a su control. I/S representa el índice de modificación de la radiactividad incorporada " corregida ".

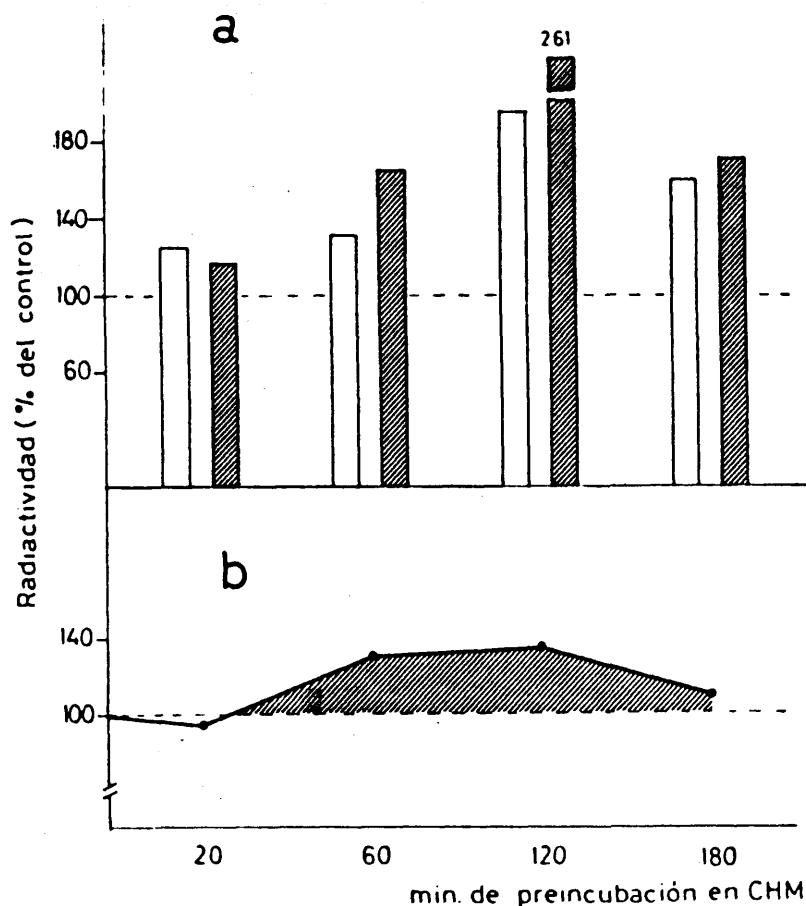




Figura 26.- Efecto " in vitro " de la CHM sobre la captación e incorporación de uridina. Para cada tiempo de preincubación con la droga, la media de los resultados obtenidos para la radiactividad ácido-soluble, incorporada, e incorporada " corregida " (véanse tablas 17 y 18) se representa gráficamente como tanto por ciento del correspondiente control no tratado

En a:  radiactividad ácido-soluble .
 radiactividad incorporada.

En b: radiactividad incorporada " corregida " .
 El área rayada denota la activación resultante.

Tabla 19.- Modificación de la radiactividad ácido-soluble e incorporada por aplicación " in vitro " de ANS. Tras un período variable de preincubación " in vitro " con 20 µg/ml de ANS, y un breve marcado con uridina-H³, la radiactividad ácido-soluble (S) e incorporada (I) fueron medidas en glándulas salivales de Ch. thummi. Como control, se emplearon sus glándulas hermanas, no tratadas con la droga. C, control; Tr, tratadas. Los valores corresponden a cuentas por glándula.

minutos de preincubación

Experimento	20			60			120			180		
	S	I	I/S	S	I	I/S	S	I	I/S	S	I	I/S
1	1,40	1,02	0,73	0,98	1,09	1,11	2,00	2,65	1,32	1,19	3,56	3,00
2	1,09	0,97	0,89	0,89	1,29	1,45	1,08	1,41	1,30	1,57	2,90	1,85
3	2,11	2,07	0,98	1,54	1,90	1,23	2,68	3,20	1,22	2,16	4,14	1,92
4				1,80	2,29	1,27				2,05	1,82	0,89

Tabla 20.- Modificación de la tasa de captación e incorporación de uridina, por aplicación " in vitro " de ANS. Los valores correspondientes a la radiactividad ácido-soluble (S) e incorporada (I), recogidos en la tabla 19, son aquí expresados como índice de modificación en las glándulas tratadas respecto a su control. I/S representa el índice de modificación de la radiactividad incorporada " corregida ".

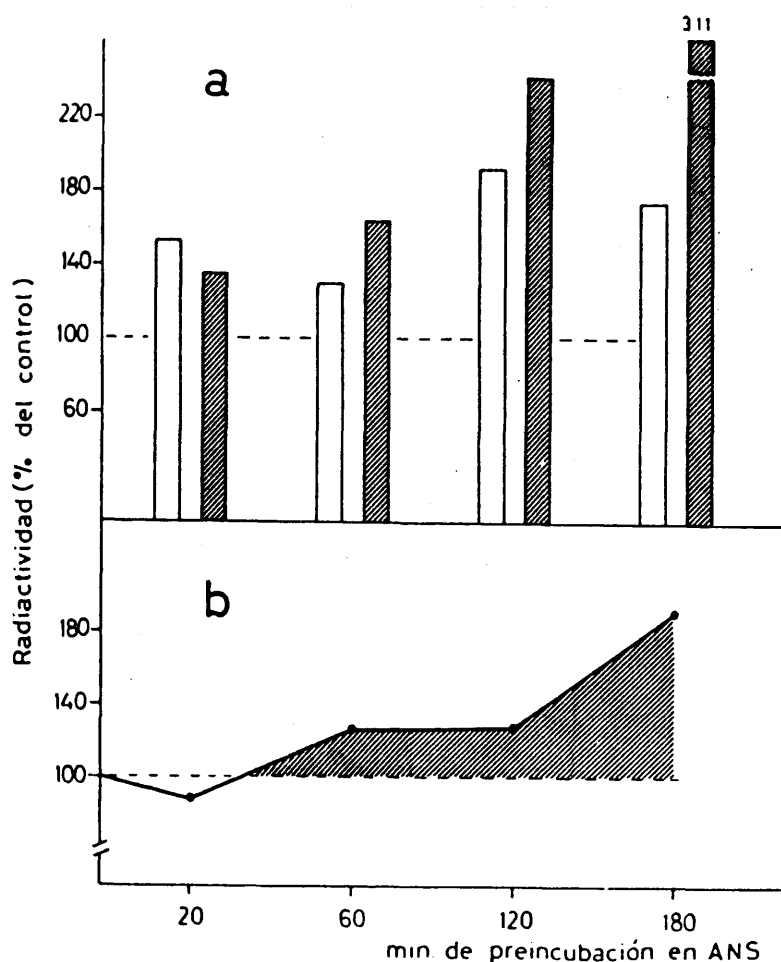




Figura 27.- Efecto "in vitro" de la ANS sobre la captación e incorporación de uridina. Para cada tiempo de preincubación con la droga, la media de los resultados obtenidos para la radioactividad ácido-soluble, incorporada e incorporada "corregida" (véanse tablas 19 y 20) se representan gráficamente como tanto por ciento del correspondiente control no tratado.

En a:  radioactividad ácido-soluble.
 radioactividad incorporada.

En b: radioactividad incorporada "corregida"

El área rayada denota la activación resultante.

mentada a medio y largo tiempo de tratamiento con la droga (fig.27 b).

Estos resultados parecen indicar que el aumento de la tasa de captación del nucleósido radiactivo puede explicar en parte, pero no totalmente, el incremento observado en la radiactividad incorporada en RNA por efecto de la CHM y ANS. Resultados semejantes se obtuvieron en otros experimentos empleando distintas concentraciones de uridina- H^3 , y que no son aquí expuestos por evitar reiteraciones. Pero dada la importancia de la conclusión alcanzada, se ha elaborado una tabla (tabla 21) mostrando el porcentaje de experimentos en los que se observó un incremento en la radiactividad incorporada " corregida ".

Droga	Experim. realizados	Muestran activación	% del total.
CHM	23	17	74
ANS	20	17	85

Tabla 21.- Glándulas salivales fueron tratadas " in vitro durante 60 - 180 min con 10 $\mu g/ml$ de CHM o 20 $\mu g/ml$ de ANS, y brevemente marcadas con uridina- H^3 . La tabla recoge el número de experimentos realizados y aquellos en los que una activación de la radiactividad incorporada " corregida " fue observada.

En resumen, la aplicación " in vitro " de CHM y ANS induce un incremento en la actividad de incorporación de uridina que no parece ser adecuadamente explicable ni por una modifi-

cación en la estabilidad del RNA recién sintetizado (al menos en el caso de la CHM, véase Resultados, 2.4.) ni, en la mayoría de los casos, por una mayor tasa de captación del precursor marcado. Ello apoya la idea de que ambas drogas, a dosis fuertemente inhibitorias de la síntesis de proteínas, logran activar el mecanismo de transcripción. Esta idea será ulteriormente confirmada por medición directa de la actividad RNA polimerasa.

4.2. Efecto de la cicloheximida y anisomicina sobre las distintas especies de RNA.

Determinada la existencia de la respuesta activadora a nivel del RNA total, se trata ahora de comprobar si tal respuesta es general, o bien presenta un carácter selectivo para las distintas especies de RNA recién sintetizado que permite diferenciar el análisis electroforético.

4.2.1. Medición de la radiactividad ácido-soluble bajo condiciones de fijación con etanol.

Como se indicó previamente (Material y Métodos, 4.1.1.), la fijación de las glándulas con etanol es especialmente deseable cuando se pretende obtener un perfil electroforético del RNA. Ello ha obligado a poner a punto un nuevo método para la medición de la radiactividad ácido-soluble intracelular, pues el normalmente empleado se basaba en la fijación en presencia de TCA.

Dos grupos de glándulas hermanas fueron marcadas durante

20 min con medio de Cannon conteniendo 1.000 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 , tras lo cual fueron sometidos a lavados sucesivos con el medio de incubación (Material y Métodos, 4.4.). Uno de los grupos de glándulas fue fijado con TCA, y la radiactividad ácido-soluble valorada por el método habitual, siendo el valor obtenido considerado como control. Las glándulas hermanas fueron fijadas por adición de 1 ml de etanol frío, y a tiempos de 5 y 10 min la fracción de radiactividad celular extraída fue valorada tomando alícuotas del alcohol de fijación; tras ello las glándulas fueron digeridas en presencia de pronasa, valorándose sobre el digesto la radiactividad total y ácido-insoluble.

En la tabla 22 se recogen los valores de radiactividad medidos sobre el TCA y etanol, expresados como cuentas por glándula. De estos datos se puede deducir que:

+) En primer lugar, son suficientes 5 min de fijación para alcanzar el máximo de extracción posible con etanol.

+) En todo caso, esta fracción extraída es muy baja, cuando se compara con los valores obtenidos con TCA.

En consecuencia, para medir la radiactividad ácido-soluble, en condiciones de fijación con etanol, habrá de sumarse la fracción extraída por el fijador (Et) con la que permanece en el interior de las células. Esta última será estimada por la diferencia entre la radiactividad total (T) y ácido-insoluble (I), medidas sobre el digesto de ácidos nucleicos.

Experimento	TCA	Etanol		Et./TCA (10 min.)
		5 min.	10 min.	
1	114.290	13.400	13.615	0,12
2	93.655	11.820	11.770	0,13
3	74.345	11.875	13.250	0,18
Media : 0,14				

Tabla 22.- Rendimiento comparado de la extracción de radioactividad ácido-soluble intracelular con TCA y etanol. Grupos de glándulas hermanas, brevemente marcadas con uridina- H^3 , fueron fijadas con TCA o etanol absoluto (Et). La radioactividad extraída en los medios de fijación fue valorada y comparada en ambos casos.

Experimento	TCA	Etanol			$\frac{T-I+Et}{TCA}$
	S	T	I	T-I+Et.	
1	114.290	84.640	2.503	95.752	0,84
2	93.655	70.448	1.789	80.429	0,86
6	74.345	62.890	1.641	74.499	1,00
Media : 0,90					

Tabla 23.- Caracterización del método de medida de la radioactividad ácido-soluble bajo condiciones de fijación con etanol. Las glándulas fijadas con etanol (ver tabla 23) fueron digeridas en presencia de pronasa, y la radioactividad total (T) y ácido-insoluble (I) del digesto medidas. El valor para la radioactividad ácido-soluble fue calculado y comparado con el obtenido por fijación en TCA. Los valores dados corresponden a cuentas por glándula.

La fórmula resultante será entonces:

$$S = T - I + Et$$

En la tabla 23 los valores de radiactividad obtenidos de este modo son comparados con los valores control obtenidos en las glándulas hermanas (fijadas con TCA). Los resultados son comparables, por lo que el procedimiento descrito puede ser aceptado como método alternativo para la medición de la radiactividad celular ácido-soluble y, por ello, estimar la tasa de captación de uridina por las células.

4.2.2. Análisis electroforético.

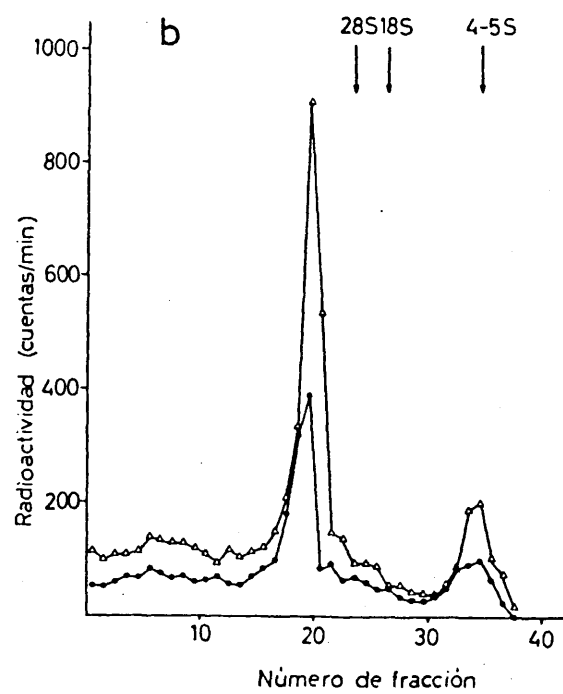
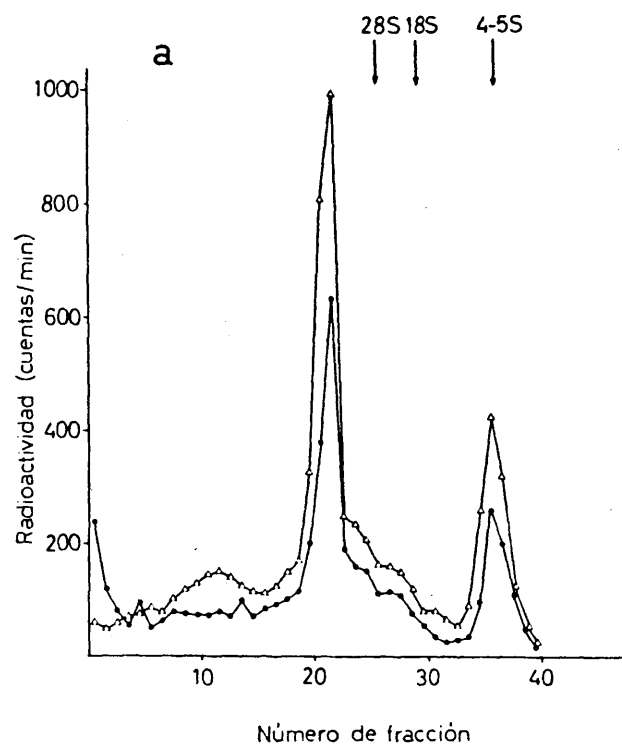
Un estudio preliminar llevado a cabo con *Ch. pallidivittatus* mostraba que , cuando las glándulas eran brevemente marcadas " in vitro " con uridina- H^3 en presencia de CHM o ANS, se producía un incremento en la radiactividad incorporada, afectando aparentemente a todas las familias de RNA recién sintetizado distinguibles en el perfil electroforético, sin que ningún efecto selectivo pudiera ser apreciado (véase fig.28). Con el fin de estudiar más a fondo este comportamiento, un planteamiento experimental más riguroso fue llevado a cabo con larvas de *Ch. thummi*.

Glándulas salivales fueron preincubadas en medio de Cannon conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM durante 60 o 180 min, siendo entonces marcadas durante 10 min por adición de uridina- H^3 hasta una concentración de 2.000 $\mu\text{Ci/ml}$, siempre en presencia de

Figura 28.- Efecto " in vitro " de la CHM y ANS sobre la actividad de incorporación en distintas especies de RNA. Glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron marcadas durante 20 min con 750 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM (a) o de 10 $\mu\text{g/ml}$ de ANS (b), y los ácidos nucleicos extraídos y separados por electroforesis. Como control, las glándulas hermanas de aquellas fueron marcadas en ausencia de la droga.

● — ● : control.

△ — △ : glándulas tratadas.



la droga. Tras ser fijadas con etanol, las glándulas fueron procesadas para estimar la radiactividad ácido-soluble, tal como fue previamente indicado (Resultados, 4.3.1.). El remanente no utilizado del extracto de ácidos nucleicos fue purificado por precipitación alcohólica, y el RNA analizado por electroforesis. Como control, en cada caso un proceso igual fue llevado a cabo con las glándulas hermanas de aquellas, en ausencia de la droga.

Con el fin de que los perfiles resultantes correspondieran a radiactividad incorporada " corregida ", fueron calculados los coeficientes de corrección S_c/S_{tr} , tal como se indicó anteriormente (Resultados, 3.6.), y los valores de radiactividad de cada fracción del perfil correspondiente a glándulas tratadas fueron corregidos conforme a dichos coeficientes.

Un proceso experimental idéntico al anterior fue llevado a cabo usando ANS a concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, siendo también aplicada a 60 y 180 min de preincubación.

Los perfiles de radiactividad resultantes se representan en la fig.29, para el caso de la CHM, y en la fig. 30 para el caso de la ANS.

Para la interpretación de estos perfiles ha de considerarse, en primer lugar, la aparición de picos subsidiarios situados tras el pre-rRNA 38S, como ya fue anteriormente constatado (Resultados, 1.4.1.). Su tamaño es especialmente prominente

Figura 29.- Efecto " in vitro " de la CHM sobre el perfil de RNA recién sintetizado. Glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron preincubadas " in vitro" con 10 µg/ml de CHM durante 60 min (a) o 180 min (b), y brevemente marcadas con uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos fueron separados por electroforesis, obteniéndose los perfiles de radiactividad incorporada " corregida ". Como control, las glándulas hermanas fueron usadas, en ausencia de la droga.

●————● : control.

△————△ : glándulas tratadas.

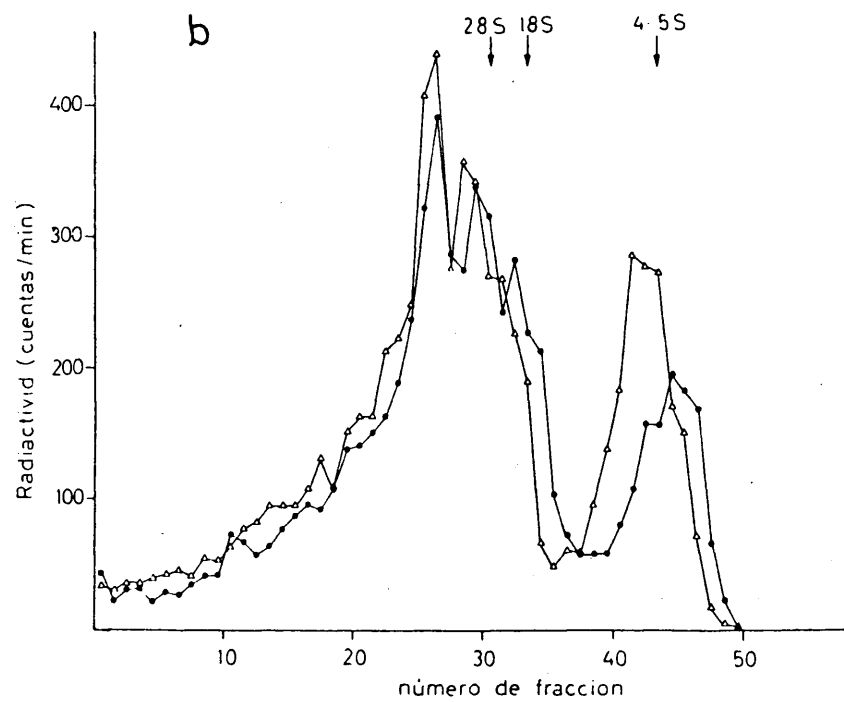
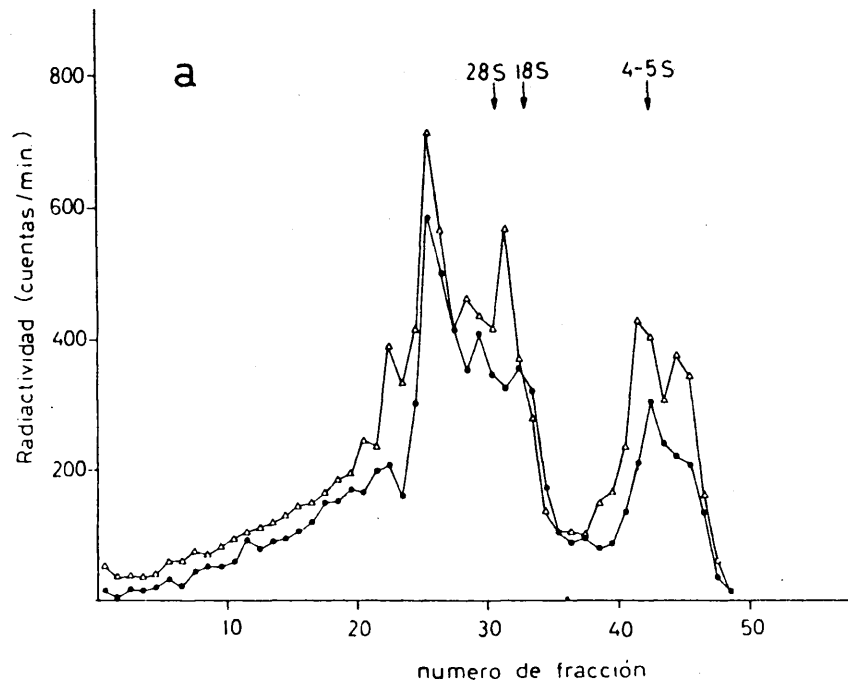
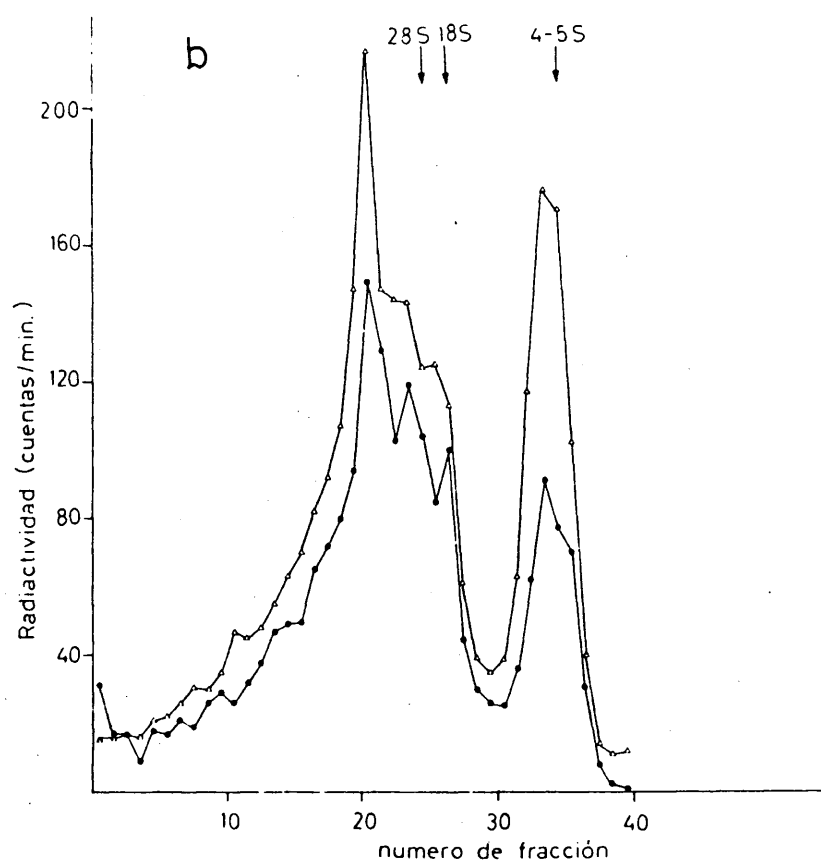
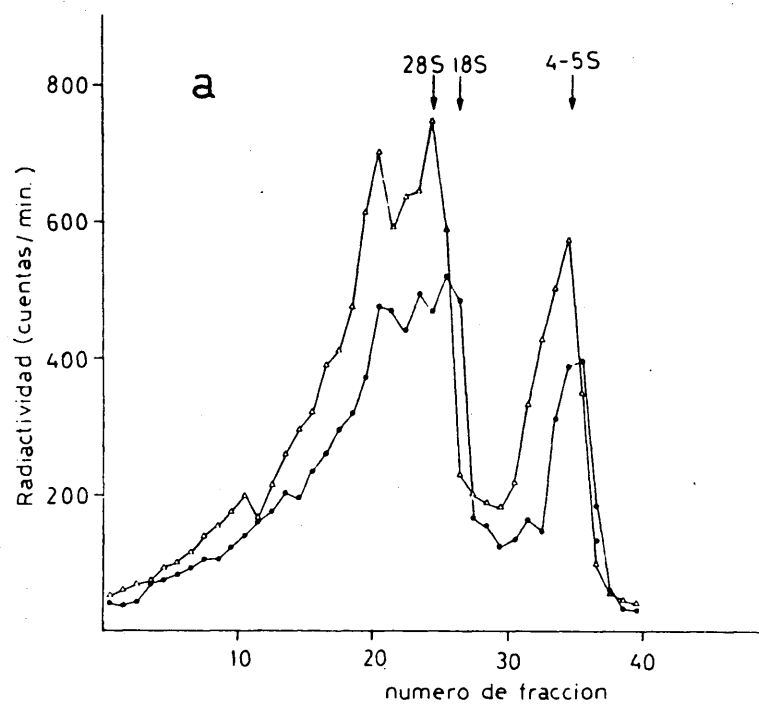


Figura 30.- Efecto " in vitro " de la ANS sobre el perfil de RNA recién sintetizado. Glándulas salivales de *Ch. thummi* fueron preincubadas " in vitro " con 20 µg/ml de ANS durante 60 min (a) o 180 min (b), y brevemente marcadas con uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos fueron separados por electroforesis, obteniéndose los perfiles de radiactividad incorporada " corregida ". Como control, las glándulas hermanas fueron usadas, en ausencia de la droga.

●————● : control.

△————△ : glándulas tratadas.



tras largos tiempos de incubación " in vitro ", y distorsionan seriamente la región del perfil correspondiente al hnRNA de pequeño tamaño. Como ya se indicó previamente, la naturaleza de estos picos no parece ser explicable como formas ribosomales estables originadas por un normal procesamiento del pre-rRNA, dado el escaso tiempo de marcado (10 min); ni tampoco como una degradación, en sentido estricto, del RNA extraído, dada la repetibilidad en la localización de estos picos y el hecho de que otras regiones del espectro no aparezcan especialmente distorsionadas. Así, no se aprecia una acumulación anormal de radiactividad en la región del RNA de pequeño tamaño, como es habitual cuando se ha producido degradación: tanto a 60 como a 180 min de preincubación " in vitro ", el valor relativo de la fracción 4-5S en los espectros control se mantiene aproximadamente en un 20% del total del perfil. Una posible explicación radicaría en que se trate de RNAs de naturaleza ribosomal, originados por una especial labilidad del transcripto primario nucleolar, debido a las condiciones artificiales de mantenimiento " in vitro " de las glándulas. Esta idea podría tener su apoyo en observaciones citológicas, que muestran que entre 1 - 3 h de incubación de las glándulas en medio de Cannon la morfología de los cromosomas se mantiene normalmente , en tanto las estructuras nucleolares aparecen especialmente dañadas.

Obviando esta dificultad, se observa claramente que el in-

cremento , por efecto de ambos inhibidores, en la tasa de radiactividad incorporada " corregida " - y, por ello, presumiblemente , en la actividad de síntesis de RNA - parece afectar a todos los componentes del perfil. Con el fin de examinar si, de todos modos, existen diferencias cuantitativamente significativas entre las diferentes especies de RNA, los perfiles fueron divididos en sus principales regiones (véase Resultados, 1.4.2.a), aunque en este caso las dos regiones intermedias (pre-rRNA y hnRNA de mediano Pm) fueron consideradas conjuntamente, debido a la ya indicada presencia de formas presumiblemente de naturaleza ribosomal sobre la región del mediano hnRNA. La radiactividad correspondiente a cada región (hnRNA de alto Pm, pre-rRNA + hnRNA de mediano Pm, RNA de bajo Pm) se obtuvo entonces sumando los valores de las fracciones que la integran.

Los resultados obtenidos , para el caso de la CHM y ANS, se recogen en la tabla 24, expresados como cuentas totales y como índice de incremento en el perfil tratado respecto a su correspondiente control. Estos índices de incremento, expresados como tanto por ciento, se representan gráficamente en la fig. 31. Como puede observarse, es la familia de RNA de pequeño tamaño (4-5S) la que resulta siempre más incrementada, en tanto la región intermedia (donde predomina cuantitativamente el RNA nucleolar) es la que en la mayoría de los casos resulta menos activada por efecto de ambos inhibidores.

Tabla 24.- Modificación de las distintas especies de RNA recién sintetizado por aplicación " in vitro " de CHM y ANS. Los perfiles electroforéticos representados en las figs. 29 y 30 fueron divididos en tres regiones, y la suma de radiactividad correspondiente a cada región calculada. C, perfil control; Tr, perfil de glándulas tratadas. Los valores son dados como cuentas totales, y como índice de incremento en el perfil de glándulas tratadas respecto al control (Tr/C).

Los valores entre paréntesis, adjuntos a los perfiles control, expresan la fracción de radiactividad que la correspondiente región representa respecto al total del perfil.

		hnRNA alto Pm	Pre-rRNA y hnRNA med. Pm	Peq. RNA (4-5 S)	Total
CHM	60 min.	(0,17)	(0,62)	(0,20)	
		C 1.395	5.098	1.664	8.157
		Tr 1.939	6.270	2.662	10.871
		Tr/C 1,39	1,23	1,60	1,33
	180 min.	(0,18)	(0,63)	(0,19)	
		C 1.164	4.067	1.196	6.427
		Tr 1.420	4.026	1.674	7.120
		Tr/C 1,22	0,99	1,40	1,11

ANS	60 min.	(0,24)	(0,56)	(0,19)	
		C 2.141	4.931	1.720	8.792
		Tr 2.855	6.231	2.629	11.745
		Tr/C 1,35	1,26	1,53	1,34
	180 min.	(0,25)	(0,55)	(0,20)	
		C 511	1.136	402	2.049
		Tr 614	1.494	732	2.840
		Tr/C 1,20	1,31	1,82	1,39

Figura 31.- Activación de las distintas especies de RNA recién sintetizado por aplicación " in vitro " de CHM y ANS. Los índices de incremento para cada región del perfil obtenidos en la tabla 24 son aquí expresados como tanto por ciento del control.



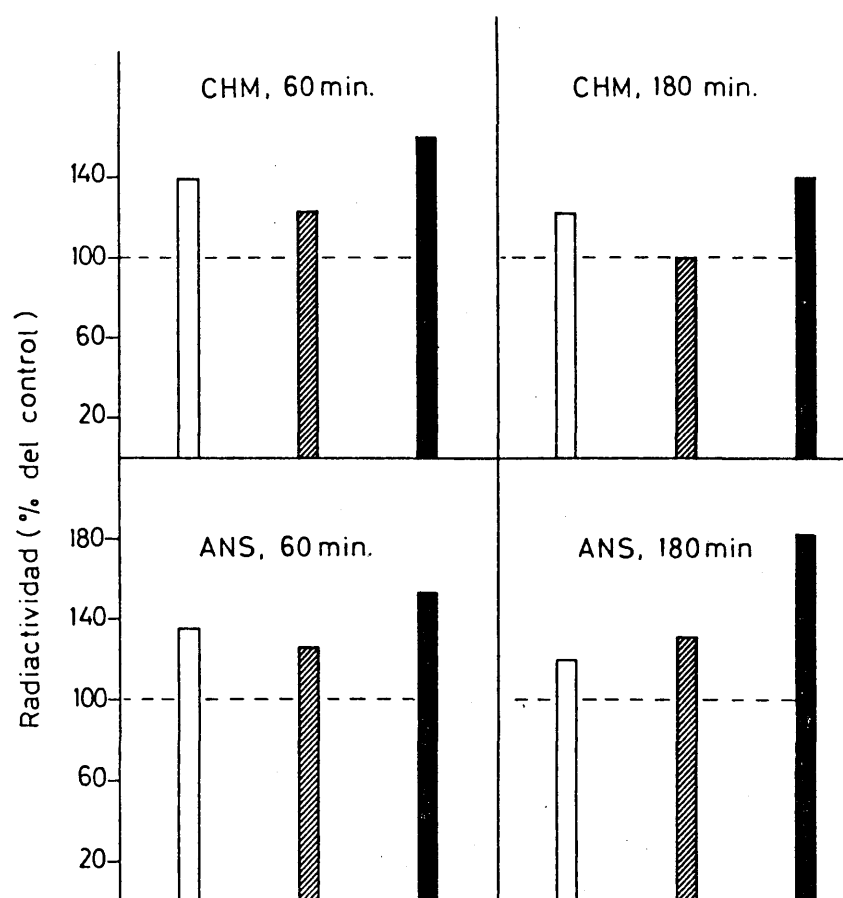
: hnRNA de alto Pm.



: pre-rRNA + hnRNA de medio Pm.



: RNA de bajo Pm (4-5S).



Estos resultados parecen apuntar hacia la existencia de una respuesta distinta de las diversas especies de RNA a la inhibición de la síntesis de proteínas. De todos modos, un comportamiento cualitativamente diferencial sólo será observado bajo condiciones de aplicación " in vivo " del tratamiento inhibitorio.

5. EFECTO " IN VIVO " DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA SINTESIS DE RNA.

Bajo condiciones de aplicación " in vitro ", la CHM y ANS parecían provocar un incremento en la actividad de transcripción , afectando, aunque en distinta medida, a todas las especies de RNA distinguibles en el perfil de electroforesis. Por su parte, la incubación " in vivo " durante 3 h con CHM, daba lugar a un claro incremento en la radiactividad incorporada en RNA (Resultados, 2.1.: tabla 6), que no parece ser explicable como un incremento en la tasa de captación del precursor, dado que ninguna alteración significativa de este parámetro era observada en las horas iniciales de tratamiento con la droga (Resultados, 3.5.: fig.24c).

En este capítulo se tratará de comprobar si, como parece, la inhibición " in vivo " de la síntesis de proteínas incrementa también la actividad de transcripción, y si este incremento muestra un carácter selectivo para las distintas familias de RNA.

5.1. Efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de RNA total y sus diferentes especies.

Un estudio previo llevado a cabo con *Ch. pallidivittatus* mostró que la actividad de incorporación en las diferentes especies de RNA recién sintetizado era diferencialmente modificada tras 3 h de tratamiento " in vivo " con CHM. Como puede

apreciarse en la fig.32, la radiactividad incorporada aparece incrementada a nivel de todo el perfil, excepción hecha del pico de RNA de origen nucleolar (pre-rRNA 38S). Estas modificaciones fueron cuantificadas dividiendo los perfiles control y tratado en sus cuatro regiones fundamentales (hnRNA de alto Pm, hnRNA de mediano Pm, pre-rRNA, y RNA 4-5S), y calculando el total de radiactividad comprendida por cada región. Los resultados, como cuentas totales y como índice de modificación en el perfil tratado respecto al control, se recogen en la tabla 25. El incremento más acusado corresponde al RNA 4-5S, y al hnRNA de alto Pm, siendo el pre-rRNA la única especie inhibida respecto al control.

Con el fin de obtener una información más completa, un nuevo estudio experimental fue llevado a cabo. Larvas aproximadamente iguales de un mismo cultivo de *Ch. thummi* fueron tratadas " in vivo " con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM, y a las horas 1, 3, 6 y 24 de tratamiento se sacrificaron 8 larvas, siendo marcadas sus glándulas durante 10 min con 2.000 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 en medio de Cannon. Tras ser fijadas con etanol absoluto, las glándulas fueron procesadas para la valoración de la radiactividad ácido-soluble, siguiendo el método ya descrito (Resultados, 4.3.1.). El remanente no utilizado del extracto de ácidos nucleicos fue purificado por simple precipitación alcohólica, y el RNA analizado por electroforesis. Como control se utilizaron larvas del mismo cultivo no tratadas

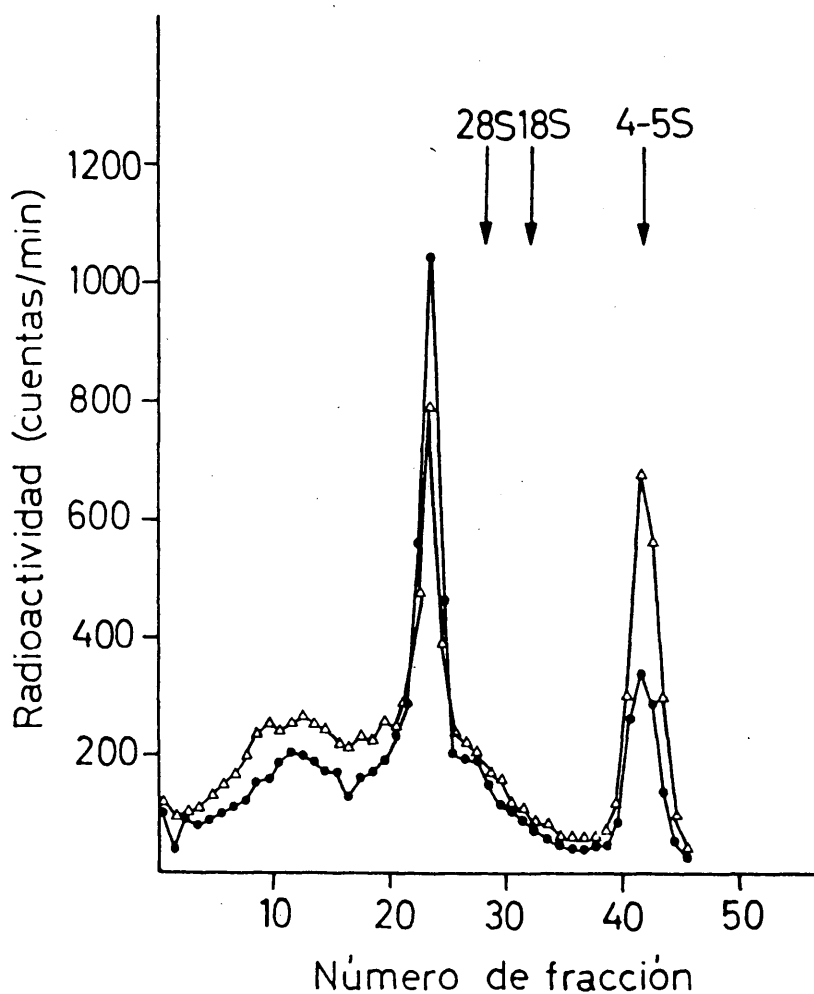


Figura 32.- Efecto " in vivo " de la CHM sobre la actividad de incorporación en distintas especies de RNA.
 Larvas de *Ch. pallidivittatus* fueron tratadas " in vivo " durante 3 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM, y sus glándulas salivales extraídas y marcadas " in vitro " durante 20 min con 750 $\mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos fueron extraídos y separados por electroforesis. Como control se utilizaron larvas no tratadas con la droga. ●—● : control; △—△ : larvas tratadas.

Perfil	hnRNA alto Pm	hnRNA medio Pm	pre-rRNA	peq. RNA (4-5S)	Total
C	2.820	1.165	2.795	1.250	8.030
Tr	3.960	1.390	2.435	2.175	9.960
Tr/C	1,40	1,19	0,87	1,74	1,24

Tabla 25.- Modificación de la radiactividad incorporada en las distintas especies de RNA recién sintetizado, por tratamiento " in vivo " con CHM. Los perfiles representados en la fig.32 fueron divididos en cuatro regiones, y la suma de radiactividad correspondiente a cada región calculada. C, perfil control; Tr, perfil de glándulas tratadas. Los valores son dados como cuentas totales , y como índice de incremento en el perfil de glándulas tratadas respecto al control (Tr/C).

con la droga.

Para que los perfiles resultantes correspondiesen a radiactividad incorporada " corregida ", se calcularon los coeficientes de corrección S_c/S_{tr} (véase Resultados, 3.6.), y los valores de radiactividad correspondientes a los perfiles de glándulas tratadas fueron corregidos conforme a dicho coeficiente. Los espectros así obtenidos se representan en la fig.33. En cada caso, a efectos de comparación, se adjunta también el perfil control.

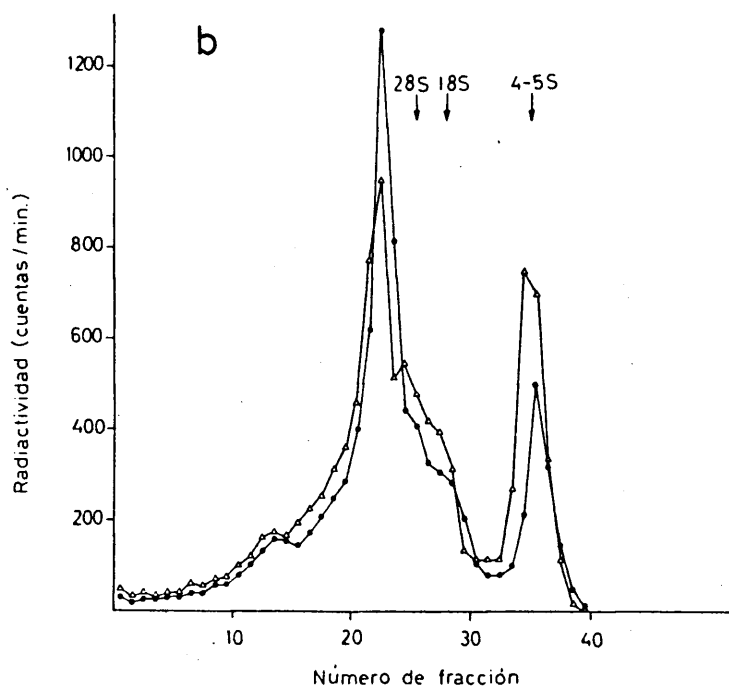
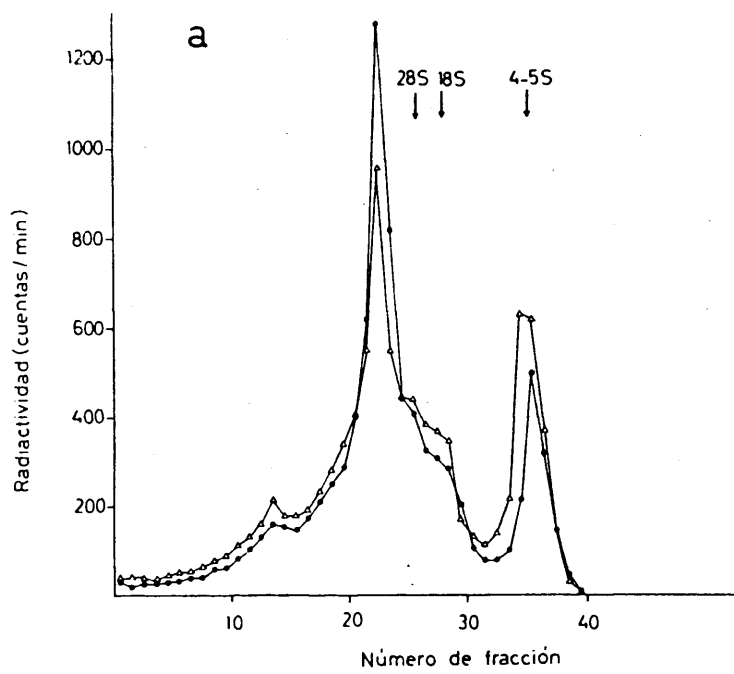
Con el fin de estimar la modificación de la síntesis de RNA, a nivel total y en sus diferentes especies, los perfiles fueron divididos en sus cuatro regiones fundamentales, y la suma de radiactividad para cada región y para el total del perfil, calculada y expresada relativamente al control (tabla 26).

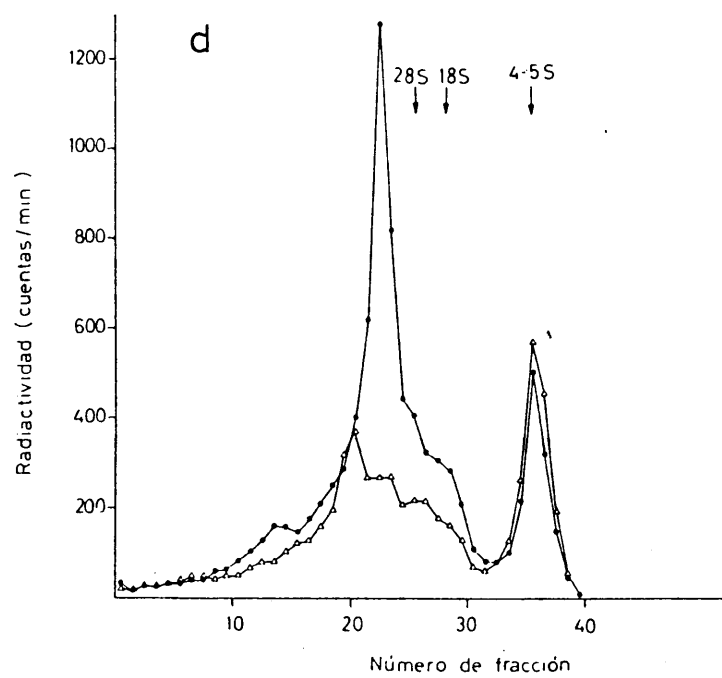
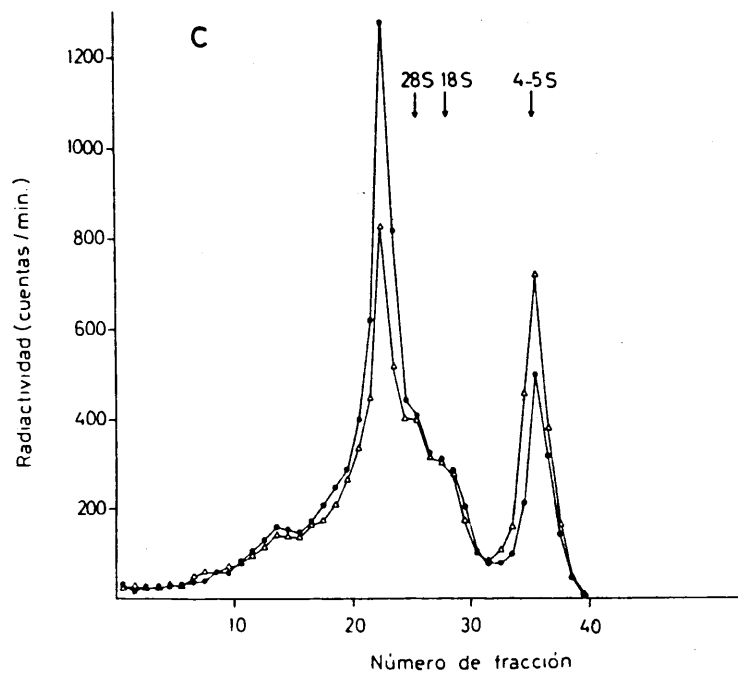
De la observación de los resultados obtenidos parece deducirse , en primer lugar, que la CHM, bajo condiciones de aplicación " in vivo ", induce un pequeño incremento inicial en la síntesis de RNA total glandular (15% a la hora 3), para dar lugar posteriormente a una clara inhibición a horas tardías de tratamiento (hora 24). Estos resultados confirman esencialmente los obtenidos previamente con *Ch. pallidivittatus* (Resultados, 2.1., tabla 6), donde se midió la incorporación no corregida de uridina- H^3 . Es de notar, sin embargo, que en dicha ocasión el incremento observado a corto

Figura 33.- Efecto " in vivo " de la CHM sobre el perfil de RNA recién sintetizado. Larvas de *Ch. thummi* fueron tratadas " in vivo " con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHM durante 1h (a), 3h (b), 6h (c) y 24h (d), y sus glándulas salivales marcadas " in vitro " brevemente con uridina- H^3 . Los ácidos nucleicos fueron separados por electroforesis, obteniéndose los perfiles de radiactividad incorporada " corregida ". Como control se usaron larvas no tratadas con la droga.

● — ● : control.

△ — △ : larvas tratadas.





Perfil	hnRNA alto Pm	hn RNA medio Pm	pre-rRNA	peq. RNA (4-5 S)	Total
Control	1.785	1.713	3.839	1.407	8.744
h 1	2.212	1.955	2.906	2.147	9.220
h1/C	1,24	1,14	0,76	1,53	1,05
h 3	2.217	1.970	3.610	2.289	10.086
h3/C	1,24	1,15	0,94	1,63	1,15
h 6	1.655	1.656	2.791	2.056	8.186
h6/C	0,93	0,97	0,73	1,46	0,94
h 24	969	1.501	1.571	1.752	5.793
h24/C	0,54	0,88	0,41	1,25	0,66

Tabla 26.- Modificación de las distintas especies de RNA recién sintetizado por tratamiento " in vivo " con CHM. Los perfiles electroforéticos representados en la fig.33 fueron divididos en cuatro regiones, y la suma de radiactividad correspondiente a cada región calculada. Los valores son dados como cuentas totales, y como índice de modificación en los perfiles de glándulas tratadas respecto al control.

tiempo de tratamiento (un 30% a la hora 3) era apreciablemente mayor que el detectado en el experimento presente. Esta discrepancia puede tener su causa, al menos en parte, en diferencias cuantitativas intrínsecas a las especies de Chironomus utilizadas. En efecto, la comparación de los datos obtenidos en los perfiles control de *Ch. pallidivittatus* (tabla 25) y de *Ch. thummi* (tabla 26) nos indican que la proporción de la especie de hnRNA de alto Pm, respecto al total del perfil, es considerablemente menor en el caso de *Ch. thummi* que en el de *Ch. pallidivittatus*, como puede observarse en la tabla 27. Dado que éste es uno de los componentes del perfil más incrementado por efecto de la CHM, ello podría explicar en buena medida que la activación a nivel del RNA total sea menor en *Ch. thummi* que en *Ch. pallidivittatus*.

	Total perfil	hnRNA de alto Pm	% del total
<i>Ch. pallidiv.</i>	8.030	2.820	35
<i>Ch. thummi</i>	8.744	1.875	20

Tabla 27. La suma de radiactividad correspondiente al total del perfil, y a la familia de hnRNA de alto Pm, son comparados en espectros provenientes de *Ch. pallidivittatus* y *Ch. thummi*.

Por último, la evolución frente al tiempo de tratamiento de cada una de las especies de RNA distinguibles en el perfil, cuantificadas en la tabla 26, se representa gráficamente en la

fig.34, como tanto por ciento del control. Estos resultados confirman el carácter diferencial de la acción " in vivo " de la CHM, que ya fue observado en *Ch. pallidivittatus* (fig.32 y tabla 25). El componente de pequeño tamaño (4-5S) es el que experimenta un máximo incremento , observable incluso a tiempos largos de tratamiento. En menor proporción, el hnRNA de alto Pm , y de mediano Pm , resultan también activados durante los tiempos iniciales, siendo después progresivamente inhibidos a horas tardías de incubación. Por último, la síntesis de RNA nucleolar resulta en todo momento inhibida por efecto de la droga.

5.2. Análisis autorradiográfico de la incorporación de uridina-H³

Con el fin de confirmar citológicamente el efecto diferencial de la CHM sobre la incorporación de uridina, larvas de un mismo cultivo de *Ch. pallidivittatus* fueron incubadas " in vivo " durante 3 h en presencia de 10 µg/ml de la droga, y las glándulas extraídas y procesadas para autorradiografía (Material y Métodos, 3.2.). Como control se emplearon larvas no tratadas del mismo cultivo. Tanto los nucleolos como los BRs 2 fueron agrupados en 3 clases, según intensidad de marcado. El criterio de clasificación fue:

- ++ : marcado muy superior al fondo citoplásmico.
- + : marcado algo superior al fondo citoplásmico
- : marcado no superior al fondo citoplásmico.

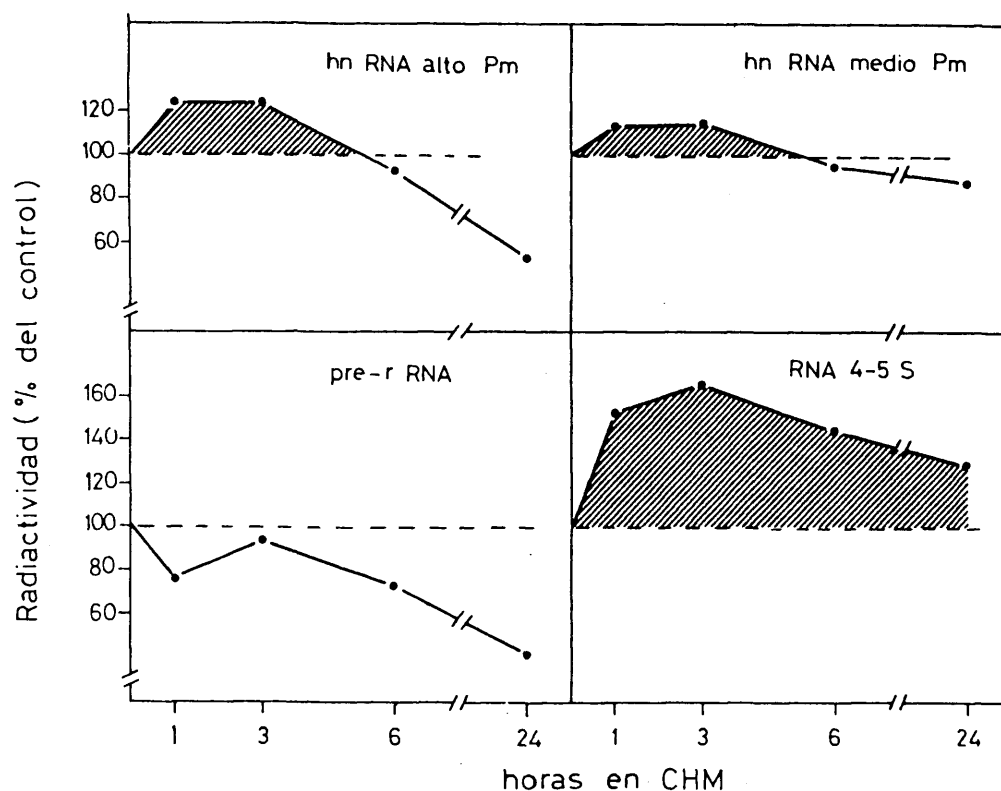


Figura 34.- Evolución de las diferentes especies de RNA con el tiempo de tratamiento " in vivo " con CHM. Los índices de modificación para cada región del perfil, expresados en la tabla 26, son aquí representados como tanto por ciento, en función del tiempo de tratamiento con CHM. El área rayada resalta la activación resultante.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 28. Como puede observarse, el tratamiento ha activado la incorporación en los BRs (incremento de un 11% en la clase de marcado alto), y ha deprimido considerablemente la incorporación sobre los nucleolos (disminución de un 24 % en la clase de marcado alto).

Un ejemplo fotográfico de estas observaciones se muestra en la fig.35. Nótese en la célula tratada (b) la considerable reducción del marcado sobre el nucleolo, y su notable incremento sobre todo el cromosoma IV, en particular sobre el BR2.

Estos datos citológicos son plenamente acordes con los resultados bioquímicos que mostraban una activación en la síntesis de hnRNA, y una inhibición del pre-rRNA, por efecto " in vivo " de la CHM.

Tabla 28.- Respuesta de la intensidad de marcado autorradiográfico a la aplicación " in vivo " de CHM. Tras 3 h. de tratamiento " in vivo " con CHM, los BR2 y nucleolos procedentes de glándulas salivales de *Ch. pallidivittatus* fueron agrupados en clases, según intensidad de marcado autorradiográfico (véanse en el texto los criterios de clasificación). El control corresponde a glándulas de larvas no tratadas con la droga.

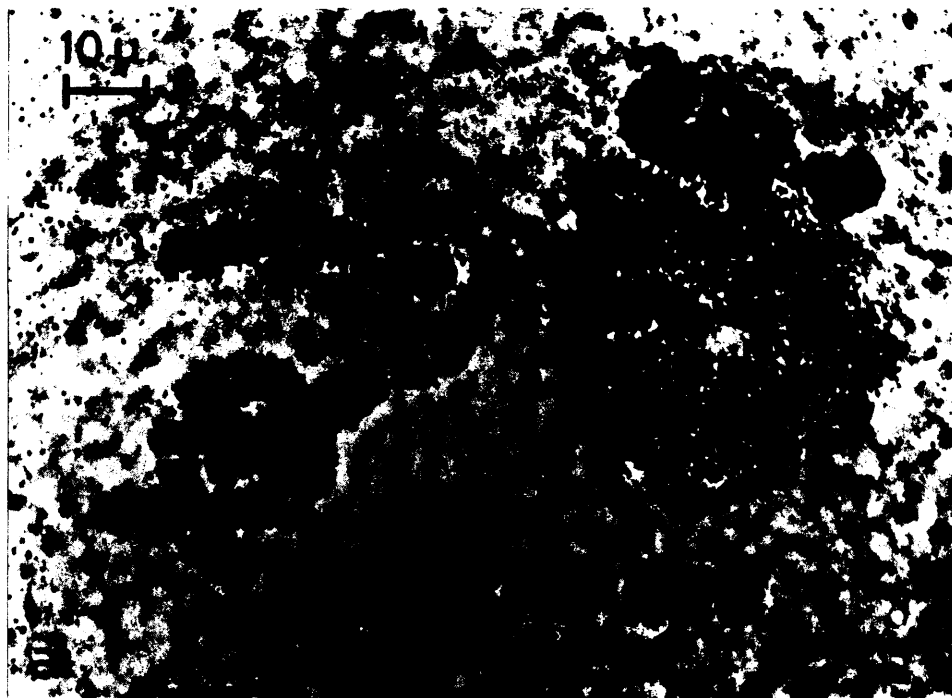
B_R_2

Marcado	Control		Tratados	
	n° anillos	% total	n° anillos	% total
++	60	69	117	80
+	22	25,3	29	20
-	5	5,7	-	-
Total	107	100	146	100

Nucleolo

Marcado	Control		Tratados	
	n° nucleol.	% total	n° nucleol.	% total
++	97	76,5	59	52
+	23	18	51	45
-	7	5,5	3	3
Total	127	100	113	100

Figura 35.- Modificación del marcado autorradiográfico
por aplicación " in vivo " de CHM. En a, célula de glán-
dula control; en b, célula de glándula tratada durante
3 h con CHM. Nótese la distinta repercusión del trata-
miento sobre el marcado en el BR2 y en el nucleolo.



6. EFFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA.

Planteamiento del problema.

La inhibición de la síntesis de proteínas mediante inhibidores específicos inducía un incremento de la incorporación de uridina que aparentemente era debido a una mayor actividad de síntesis de RNA, al no poder ser explicado (al menos en el caso de la CHM) por una variación en la estabilidad del RNA recién sintetizado ni, totalmente, por una mayor tasa de captación del precursor radiactivo. En el presente apartado pretendemos confirmar, por una vía experimental distinta, que se trata efectivamente de una mayor actividad de transcripción.

Por otro lado, en el mecanismo de transcripción se distinguen dos procesos diferentes, y por tanto susceptibles de ser controlados separadamente: la actividad de unión de las moléculas de RNA polimerasa al DNA (actividad de iniciación), y la velocidad de lectura del DNA por dichas polimerasas (velocidad de elongación del RNA nascente, o tasa de polimerización de los nucleótidos en RNA). Cabe entonces preguntarse si, de producirse una mayor actividad RNA polimerasa, ésta se debe a un incremento en la actividad de iniciación o de elongación.

Un método empleado frecuentemente para abordar estos problemas en células eucarióticas consiste en la estimación de la actividad RNA polimerasa en núcleos aislados, sobre la base de la tasa de incorporación de un precursor radiactivo

apropiado (p.e., UMP-H³). Este método permite soslayar problemas tales como las alteraciones en la captación del precursor (Pogo et al., 1966); por otro lado, los distintos procesos implicados en el mecanismo de transcripción pueden ser separadamente examinados, considerando que en núcleos aislados existe sólo prácticamente actividad de elongación (Widnell y Tata, 1964; Maul y Hamilton, 1967; Pogo, 1969). La aplicación de este método, sin embargo, tropezaría con ciertas dificultades en nuestro sistema biológico, para este tipo de estudios.

Existe una técnica alternativa, empleada con éxito en diversos sistemas eucarióticos para la localización y medida " in situ " de la actividad RNA polimerasa endógena. Esta técnica se fundamenta en que, tras una breve fijación de las células, tanto la RNA polimerasa nucleolar como nucleoplásmica son reactivadas por incubación de los ribonucleósidos trifosfatados (ATP, GTP, CTP y UTP-H³), reiniciándose su polimerización en RNA (Moore, 1978). Este método permite obviar problemas tales como las posibles variaciones en la tasa de captación o fosforilación del precursor marcado, o de la estabilidad del RNA recién sintetizado, los cuales sí podían interferir al trabajar con células vivas. Por ello, la suma de radiactividad incorporada ha de ser una medida directa de la actividad RNA polimerasa dependiente de DNA. Por otro lado, los dos procesos implicados en el mecanismo de transcripción pueden ser distinguidos, dado que bajo estas condiciones no existe

nueva actividad de iniciación, sino sólo elongación de aquellas cadenas de RNA nascente iniciadas anteriormente a la fijación de las células (Moore, 1978). Por ello, si la velocidad de elongación no es alterada, la cantidad de RNA sintetizada (medida como incorporación de UTP- H^3) estará directamente relacionada con el número de RNA polimerasas actualmente unidas al DNA.

Proceso experimental

Dos grupos de glándulas hermanas fueron incubadas " in vitro " durante 3 h en medio de Cannon, uno de ellos en presencia de 10 μ g/ml de CHM, y el otro, usado como control, en ausencia de la droga. Tras ello el medio de incubación fue retirado , y las glándulas fueron fijadas en etanol-acetona y procesadas para la estimación de la actividad RNA polimerasa endógena (Material y Métodos, 4.6.). Los ácidos nucleicos fueron finalmente extraídos y purificados por simple precipitación alcohólica, midiéndose la radiactividad ácido-insoluble.

El experimento fue llevado a cabo por triplicado.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 29.

Como puede observarse, el tratamiento previo con CHM ha dado lugar a un incremento de la actividad de incorporación de UTP- H^3 . Por las razones anteriormente expuestas podemos concluir que:

a.- La CHM, bajo condiciones de aplicación " in vitro ", da lugar a una real activación del mecanismo de transcripción,

Experimento	Cuentas/g		$\frac{\text{Tr}}{\text{C}} \times 100$
	C	Tr	
1	72	88	122
2	123	158	128
3	113	144	127
Media			126

Tabla 29.- Repercusión de la CHM sobre la actividad RNA polimerasa. La actividad de incorporación de UTP-H³ en glándulas fijadas, previamente tratadas " in vitro " durante 3 h con CHM, fue medida y comparada con la incorporación en glándulas no tratadas con la droga. C, control; Tr, glándulas tratadas.

sin que esta conclusión pueda ahora ser cuestionada por posibles efectos colaterales de la droga sobre otros procesos metabólicos relacionados.

b.- El coeficiente de incremento en la incorporación de UTP- H^3 en células fijadas es de una magnitud semejante al incremento previamente determinado para la actividad de incorporación " corregida " de uridina en células vivas (véase Resultados, 4.2., fig.26). Esta semejanza habla en favor de que otros procesos metabólicos que no han sido controlados directamente - p.e., la actividad de fosforilación de la uridina- H^3 - no han de verse modificados, al menos en una medida muy acusada, por efecto de la droga.

c.- Por último, el incremento en la incorporación de UTP- H^3 no puede ser explicado como una mayor tasa de elongación de RNA nascente, pues el medio de incubación conteniendo CHM es retirado previamente, y la incubación de las glándulas fijadas con el isótopo se lleva a cabo siempre en las mismas condiciones, en ausencia de la droga. La explicación ha de estribar entonces en que hay un mayor número de cadenas de RNA en formación en las células pretratadas con el inhibidor, lo que implica que la CHM ha activado la tasa de unión de las RNA polimerasas al DNA. En consecuencia, la CHM parece actuar incrementando, al menos, la actividad de iniciación.

DISCUSSION

El fenómeno de la expresión génica en organismos eucarióticos constituye un problema de gran actualidad, pero sumamente complejo y oscuro. Su investigación está siendo llevada a cabo mediante el empleo de diferentes sistemas biológicos que favorecen la aproximación experimental a alguno de los aspectos parciales de dicho fenómeno. En concreto, las células politenizadas de *Chironomus* presentan condiciones excepcionales para el abordaje del nivel primario de la expresión génica, la transcripción, por cuanto permiten conjugar una doble vía de análisis:

+) citológica: fundamentalmente, por el análisis del estado de puffing y sus modificaciones.

+) bioquímica: por análisis directo de los productos de transcripción.

En este contexto, la presente Tesis ha pretendido iniciar un acercamiento, a nivel molecular, al problema del control de la expresión génica en células politenizadas de *Chironomus*, en orden a una ulterior correlación de los datos alcanzados con la información más amplia que ya se posee a nivel morfológico. Este carácter de iniciación explica la naturaleza metodológica de una gran parte del trabajo, pues ante todo ha sido preciso un amplio estudio infraestructural en orden a poner a punto las técnicas de análisis bioquímico aptas para nuestro material biológico.

Por tal causa, los resultados obtenidos pueden ser agrupa-

dos, para su discusión, en dos grandes apartados:

+) aspectos metodológicos.

+) efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la actividad de transcripción.

1.- ASPECTOS METODOLOGICOS.

1.1. Sobre los estudios preliminares.

El trabajo metodológico realizado ha hecho posible, en algunos puntos, una mejor caracterización de las técnicas empleadas para la extracción y análisis del RNA sintetizado en las glándulas salivales. En concreto:

a.- El método decrito de una breve digestión en presencia de pronasa, y los métodos de purificación del digesto empleados, han demostrado dar como resultado un extracto de elevado grado de pureza en ácidos nucleicos.

b.- La caracterización enzimática con DNasa y RNasa nos ha permitido comprobar que la radiactividad ácido-insoluble medida sobre un extracto de ácidos nucleicos, tras un breve marcado con uridina- H^3 , es una estimación directa de la radiactividad incorporada en RNA, sin que se produzca incorporación sensible en otro tipo de macromoléculas, como ha sido observado en otros sistemas biológicos (p.e., células vegetales).

c.- La adopción de unas condiciones adecuadas de incubación " in vitro " de las glándulas salivales es de especial interés, en orden ha posibilitar la aplicación de tratamien-

tos directamente sobre el tejido glandular, sin que los posibles efectos sean mediatizados por procesos ocurrentes a nivel de la totalidad del organismo larvario. En este sentido, los estudios realizados sobre la cinética de incorporación " in vitro " de uridina- H^3 nos ha permitido:

+) Asegurarnos del mantenimiento " in vitro " de la fisiología del sistema de transcripción en las glándulas aisladas.

+) En algún caso, establecer los límites de tiempo en los que dicho sistema de incubación puede, con garantía, ser aplicado: p.e., hasta 3 horas en medio de Cannon. En este aspecto, nuestros datos pueden cuestionar seriamente la validez de resultados que han sido obtenidos bajo períodos muy largos de incubación " in vitro ": p.e., hasta 13 horas con glándulas de *Ch. thummi* en medio de Cannon (Serfling et al., 1974).

c.- La electroforesis en gel de agarosa, bajo nuestras condiciones de aplicación, ha demostrado ser un método muy adecuado para el análisis del RNA en este sistema biológico. En efecto, si bien es cierto que una separación mejor entre RNAs muy proximos puede ser obtenida mediante otras técnicas de fraccionamiento más usadas (p.e., geles de poliacrilamida), los geles de agarosa tienen la ventaja de que permiten conjugar una separación suficiente entre las principales especies de RNA con la presencia simultánea en el perfil de RNAs de muy distinto peso molecular: p.e., desde el tRNA 4S hasta los grandes mensajeros específicos , de alto coeficiente de sedi-

mentación.

d.- Por último, hemos constatado la existencia de diferencias metabólicas muy acusadas entre larvas distintas, incluso siendo larvas hermanas del mismo grado de desarrollo. En este aspecto, la adopción de un sistema que permite comparar resultados sobre glándulas hermanas, cuando las condiciones experimentales lo permiten (estudios " in vitro "), ha demostrado ser altamente eficaz en orden a evitar la distorsión de los resultados obtenidos por la variabilidad inherente al propio material biológico.

1.2. Sobre la actividad de captación de uridina.

De todos los aspectos metodológicos, el más destacable ha sido, sin duda alguna, la puesta a punto para nuestro sistema biológico de un método adecuado que nos permite estimar el contenido de radiactividad soluble intracelular, lo que proporciona a su vez una medida relativa de la tasa de entrada en la célula del nucleósido precursor, y de sus posibles modificaciones por diversos tratamientos.

La entrada de uridina, bajo condiciones de incubación " in vitro ", resulta diferencialmente modificada por diversos tratamientos (p.e., activada por CHM, ANS y α -amanitina; ligeramente inhibida por DMSO). Por otro lado nuestros resultados parecen indicar - de acuerdo con lo descrito en otros sistemas biológicos - que la entrada del nucleósido se realiza por un mecanismo de transporte activo, siendo además factor limitante

de su posterior tasa de incorporación en ácidos nucleicos. En consecuencia, hemos de afirmar que la simple estimación de la radiactividad incorporada no puede sin más ser tomada como una medida directa de la actividad de transcripción y sus modificaciones. Esto nos ha llevado a la necesidad de elaborar y aplicar coeficientes de corrección, los cuales son capaces de modificar cuantitativa o incluso cualitativamente (p.e., en el caso del choque térmico) las conclusiones inicialmente formuladas por la sólo consideración de la radiactividad incorporada.

Por ello, y de acuerdo con Sutton y Kempt (1976) hemos de cuestionar seriamente el rigor de muchos resultados, ofrecidos en la literatura, que han olvidado sistemáticamente la consideración de este parámetro. En particular, nunca, que sepamos, había sido experimentalmente abordado al trabajar con células politenizadas, incluso en los análisis más precisos recientemente publicados.

Adicionalmente, el estudio aquí iniciado ha abierto nuevas puertas de investigación en torno a aspectos nunca abordados. En concreto, el concepto de " tasa de aprovechamiento " (radiactividad incorporada versus radiactividad captada) es un factor de gran utilidad en estudios, actualmente en curso en nuestro laboratorio, acerca de ciertas diferencias intrínsecas sistemáticamente ocurrentes en el desarrollo larvario.

En relación al núcleo temático del presente trabajo, el

aspecto fundamental es el tocante a la repercusión de la CHM y ANS sobre la actividad de captación de uridina. Son muy pocas y contradictorias las observaciones existentes en la literatura. Así, la CHM no parece modificar la tasa de captación del nucleósido en *Achyla* (Timberlake y Griffin, 1974b), o en plántulas de rábano (Delseny et al., 1977); sin embargo logra incrementarla ligeramente en levaduras (Foury y Goffeau, 1973), y considerablemente en cultivos de fibroblastos (Hershko et al., 1971). Nuestros mismos resultados parecen indicar una clara discrepancia en el efecto de la CHM y ANS sobre la tasa de captación, a corto período de tiempo (hasta 3 h), según sean aplicadas " in vivo " (no modificación) o " in vitro " (activación). La posibilidad de interpretación de estos datos excede a nuestras posibilidades actuales.

2. RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE TRANSCRIPCION A LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS.

La disponibilidad de la metodología adecuada nos ha permitido, en segundo lugar, estudiar el efecto que una inhibición drástica de la síntesis de proteínas, por aplicación de inhibidores específicos, produce sobre la síntesis de RNA, a nivel total y en sus diferentes especies. En este aspecto, los resultados obtenidos nos han mostrado que:

+) La actividad de transcripción resulta globalmente incrementada.

+) Dicho incremento posee un carácter selectivo.

2.1. Sobre el incremento de la síntesis de RNA.

La existencia de un incremento en la tasa de transcripción como respuesta a la inhibición de la síntesis de proteínas ha sido probada en esta Tesis por vía de análisis bioquímico, y encuentra además una confirmación en ciertas evidencias morfológicas complementarias.

a.- Parece probarse, en primer lugar, por vía indirecta de razonamiento. En efecto, la aplicación de CHM y ANS bajo distintas condiciones de tratamiento inducía un incremento en la radiactividad incorporada en RNA, no explicable ni por una modificación en la estabilidad del RNA recién sintetizado ni, al menos totalmente, por una mayor tasa de captación del precursor marcado. Ello apoya la idea de que el sistema de transcripción resulta efectivamente activado. Esta conclusión es

plenamente coincidente con la formulada por Foury y Goffeau (1973), siguiendo una vía de argumentación semejante, por aplicación de CHM y ANS en levaduras.

b.- La existencia de una respuesta activadora ha sido probada ulteriormente, de modo inequívoco, mediante el empleo de células fijadas. Por esta vía experimental, la detección de un incremento en la incorporación de UTP-H³ en células pre-tratadas con CHM es una medida directa de un incremento en la actividad RNA polimerasa dependiente de DNA, sin que en este caso la estimación pueda ser perturbada por otros procesos metabólicos relacionados.

Esta conclusión que hemos alcanzado por vía bioquímica se ve apoyada por otras observaciones obtenidas en diversos sistemas biológicos, mostrando un incremento en la radiactividad incorporada en RNA como respuesta a una inhibición de la síntesis de proteínas. Tal cosa ocurre, p.e., en procariotes: por aplicación de estreptomycin en cepas de E. coli estreptomycin-dependientes (Spotts y Stanier, 1961), o por adición de cloranfenicol en cultivos en fase de crecimiento estacionario (Fraenkel y Neidhart, 1961) o bajo control de los genes de restricción (Hershko et al., 1971; Ryan y Boreck, 1971). Semejantemente, en células eucarióticas la CHM es capaz de producir un incremento en la radiactividad incorporada (p.e., Saccharomyces: Siegel y Sisler, 1964; células hepáticas: Verbin et al., 1969; en RNA viral infectivo de células superiores:

Stuart et al., 1974); o provocan una parcial recuperación de la actividad de incorporación previamente deprimida por sometimiento de las células a dieta carente de algún nutriente esencial (Smulson y Thomas, 1969; Smulson, 1970, en células de mamíferos; Gross y Pogo, 1974, en levaduras). El mismo efecto ha sido observado con otros inhibidores (p.e., con ANS a baja dosis en hígado de rata: Rizzo y Webb, 1969; ANS y emetina, en células HeLa: Grollmann, 1967), o por la simple aplicación de una dieta deficiente (Mandel y Quirin-Stricker, 1967; Quirin-Stricker y Mandel, 1968).

En todo caso es preciso hacer notar que la mayoría de estas observaciones se limitan a constatar un incremento en la radiactividad incorporada, lo cual, por las razones repetidamente apuntadas con anterioridad, no puede ser tomado, sin más, como una medida directa de la actividad de transcripción.

c.- La existencia de una respuesta activadora, probada a nivel bioquímico, se ha visto además confirmada a nivel morfológico. Observaciones realizadas en nuestro laboratorio han mostrado que la aplicación de CHM y ANS induce la recuperación del tamaño en el BR2 de *Ch. thummi*, previamente colapsado por tratamiento de las larvas con galactosa (Santa-Cruz, en preparación). Si consideramos que el puff es la manifestación morfológica de una actividad de transcripción particularmente intensa, la observación expuesta es un argumento claro en favor de

que, al menos a nivel de algunos loci, la inhibición de la síntesis de proteínas puede dar lugar a una reactivación de la tasa de transcripción.

Por último, hemos de notar que la respuesta activadora presenta dos características:

+) Se trata de una respuesta a nivel estrictamente celular, como se prueba de su detección bajo condiciones de experimentación " in vitro ". No es, pues, imputable a otros procesos metabólicos distintos a la acción de la droga misma, tal como, p.e., una modificación en el aporte hormonal, que según se ha observado en otros sistemas podría dar también lugar a una activación de la síntesis de RNA.

+) El incremento en la actividad de transcripción responde, al menos en parte, a una mayor actividad de iniciación (i.e., unión de las RNA polimerasas al DNA), como ha podido deducirse del ensayo de la actividad RNA polimerasa en células fijadas. Esta conclusión es plenamente acorde con la alcanzada por Gross y Pogo (1974), en levaduras tratadas con CHM, o por Mandel y Quirin-Stricker (1967), al inhibir la síntesis de proteínas en células hepáticas mediante una dieta deficiente. En todo caso, si además se produce o no una modificación en la tasa de elongación del RNA nascente, es algo que no puede responderse, dada la naturaleza de nuestros experimentos.

2.2. Sobre el carácter selectivo de la activación

El análisis electroforético nos ha permitido distinguir el comportamiento particular de los principales componentes del RNA recién sintetizado en glándulas salivales:

- +) hnRNA (destacando especialmente el de gran peso molecular).

- +) pre-rRNA.

- +) RNA de bajo peso molecular (4-5S).

Los perfiles de radiactividad muestran que para las mismas condiciones experimentales, las distintas especies de RNA se ven diferencialmente modificadas:

- cuantitativamente: bajo condiciones de inhibición " in vitro " de la síntesis de proteínas.

- cualitativamente (i.e., mostrando una depresión selectiva del pre-rRNA): bajo condiciones de inhibición " in vivo ".

Para su discusión, las distintas especies distinguibles en el perfil serán agrupadas en dos grandes categorías:

- +) RNA de origen nucleoplásmico (extranucleolar).

- +) RNA de origen nucleolar.

2.2.1. RNA nucleoplásmico.

La mayor parte de las observaciones existentes en la literatura indican que el RNA nucleoplásmico resulta menos o sólo más tardíamente inhibido, por efecto de la CHM, que el RNA nucleolar (p.e., Willems et al., 1969), o incluso no parece significativamente afectado (Schmid y Sekeris, 1973). Es de notar que en algunos casos los datos presentados parecen indicar la existencia de una ligera activación temporal de esta fracción del RNA (p.e., Higashi et al., 1968; Muramatsu et al., 1970), pero esta activación no es explícitamente comentada por los autores.

Nuestros resultados, por el contrario, muestran muy claramente que la inhibición drástica de la síntesis de proteínas, tanto " in vivo " como " in vitro ", produce un incremento en la síntesis de RNA extranucleolar, tal que:

- +) es máximo, y más duradero, para el RNA de pequeño tamaño (4-5S).

- +) es menos acusado y más transitorio para el hnRNA.

En el contexto de nuestro trabajo, son de especial interés algunas de las observaciones tocantes al comportamiento del RNA de pequeño tamaño, por cuanto pueden indicar la existencia de un mecanismo específico de regulación para estas especies. Junto a ciertas indicaciones de que la CHM puede inhibir su síntesis (Viau y Davis, 1970, en *Neurospora*; Ro-Choi

et al., 1970, en células de mamíferos), referencias más recientes indican que la síntesis de tRNA puede verse considerablemente incrementada por aplicación de ciertos inhibidores de la síntesis de proteínas. Entre éstas, son especialmente sugerentes las observaciones de Bolcsfoldi (1974) y de Westerberg et al. (1976), que parecen evidenciar una relación directa entre la tasa de síntesis de tRNA y el tanto por ciento de ribosomas que están en forma polisomal. Así, ambos fenómenos - según sus resultados - son activados por aplicación de inhibidores de la síntesis de proteínas que actúan a nivel de la fase de elongación. Sobre la base de estas observaciones, dichos autores postulan la posible existencia de un mecanismo de regulación por retrocontrol para la síntesis de tRNA, tal que las moléculas de tRNA libres (es decir, no ligadas a ribosomas) actuarían como factores represores de su propia síntesis.

Estos datos son plenamente acordes con nuestros propios resultados, por cuanto las drogas aquí empleadas (CHM y ANS) son inhibidores de la síntesis de proteínas en la fase de elongación. Adicionalmente, la hipótesis formulada de un mecanismo específico de regulación para el tRNA puede resultar muy sugerente para explicar por qué la fracción de pequeño tamaño (4-5S) resulta siempre diferencialmente activada respecto al resto de los componentes del perfil de RNA.

2.2.2. RNA nucleolar.

El comportamiento seguido por el RNA de origen nucleolar es el de más difícil discusión. Y ello:

+) Por nuestros propios resultados, que muestran una respuesta antagónica del pre-rRNA 38S, según la inhibición de la síntesis de proteínas ocurra bajo condiciones:

- " in vivo ": se produce depresión
- " in vitro ": se produce activación.

+) Por la disparidad de los mecanismos propuestos para explicar el comportamiento de esta fracción del RNA.

a.- Efecto " in vivo " de la CHM.

Nuestros resultados, mostrando que la aplicación " in vivo " de CHM, a dosis fuertemente inhibitorias de la síntesis de proteínas, deprimen pronta y selectivamente la síntesis del pre-rRNA 38S, son plenamente acordes con las observaciones realizadas en otros sistemas biológicos, acerca de la acción inhibitoria selectiva o preferencial de dicha droga sobre la actividad RNA polimerasa nucleolar (p.e., Fiala y Davis, 1965; Viau y Davis, 1970, en *Neurospora*; Timberlake et al., 1972a, en *Achyla*; Delseny et al., 1977, en plántulas de rábano; Muramatsu et al., 1970; Fakan, 1971; Schmid y Sekeris, 1973; Grummt et al., 1976, en diversos tipos celulares de mamíferos).

1) Para explicar esta inhibición selectiva, la mayoría de los autores postulan que en la transcripción de los genes nucleolares está implicada la acción de una o más proteínas de

vida muy corta, tal que su concentración en la célula disminuiría rápidamente al ser inhibida la síntesis de proteínas por aplicación de CHM (Summers et al., 1966; Franze-Fernández y Fontanive-Sanguesa, 1973; Cereghini y Franze-Fernández, 1974; Lampert y Feigelson, 1974) o cualquier otro tratamiento adecuado (p.e., puromicina: Chesterton et al., 1975; dieta deficiente: Wannemacher et al., 1971). Respecto al papel de dichas proteínas lábiles:

+) Podría tratarse de componentes estructurales de la RNA polimerasa misma (Yu y Feigelson, 1972). Esto no parece probable, dado que:

- Mediciones directas sobre la estabilidad del enzima parecen indicar que su concentración no es afectada tras varias horas de tratamiento con CHM (Benecke et al., 1973; Schmid y Sekeris, 1973; Cereghini y Franze-Fernández, 1974).

- Nuestros mismos resultados muestran que 1 hora de tratamiento con la droga produce una inhibición de la síntesis de pre-rRNA sensiblemente igual a un tratamiento largo (6 horas). Aunque desconocemos la vida media de la RNA polimerasa nuclear en *Chironomus*, habría entonces que admitir que es desusadamente corta.

+) La hipótesis alternativa, que es la normalmente admitida, postula entonces que dichas proteínas lábiles son distintas a la RNA polimerasa misma, y actúan como moduladores positivos (factores activadores) del funcionamiento del enzima.

A este respecto, los estudios más actuales, realizados mediante técnicas de experimentación in vitro, parecen indicar que el control de la actividad RNA polimerasa se ejerce a nivel de la " iniciación " (Chesterton et al., 1975; Grummt y Grummt, 1976), posiblemente regulando la disponibilidad de la cromatina para su unión con el enzima (Onhisi et al., 1977).

2) En todo caso, la hipótesis formulada se apoya sobre dos principios:

- Que la regulación ocurre primariamente a nivel de la propia actividad RNA polimerasa.

- Que el efecto de la CHM tiene lugar sólo a través de la inhibición de la síntesis de proteínas.

Existen sin embargo resultados que han apoyado la formulación de teorías alternativas.

+) Se ha observado en ocasiones que la CHM parece inhibir adicionalmente el proceso de maduración del precursor ribosómico inicial (Willems et al., 1969; Craig y Perry, 1970, en células de mamíferos; Viau y Davis, 1970, en Neurospora), así como la exportación al citoplasma de las moléculas de rRNA (Fakan, 1971, en células de mamíferos; Eckert y Franke, 1975, en Tiphimurium; Lönn y Edström, 1977, en Chironomus). Willems et al. (1969), y Craig y Perry (1970) han propuesto la hipótesis de un posible control postranscripcional, según lo cual el fenómeno primariamente controlado sería la maduración del pre-rRNA inicial. Cuando ésta es inhibida, la acumulación resultante de pre-rRNA en el nucleolo daría lugar, sólo secun-

dariamente, a la inhibición de la transcripción de los genes nucleolares.

+) Otros resultados parecen apoyar la idea de que la inhibición específica de la transcripción de los genes nucleares pudiera ser debida, al menos en parte, a un efecto directo, tóxico, de la CHM sobre la RNA polimerasa nucleolar. Así, observaciones basadas en el empleo de dicha droga a distintas concentraciones (Rizzo y Webb, 1969; Farber y Farmer, 1973; Delseny et al., 1977), o en la comparación de su efecto con el producido por otros inhibidores (Timberlake y Griffin, 1974 a,b), parecen indicar que el efecto selectivo observado de la CHM ha de ejercerse por otro mecanismo distinto a la inhibición de la síntesis de proteínas. Los datos más directos han sido aportados por análisis in vitro de la actividad RNA polimerasa. En efecto, la actividad de la RNA polimerasa I (nucleolar), convenientemente aislada y purificada, parece resultar específicamente inhibida al ser ensayada in vitro en presencia de CHM, sin que la droga parezca afectar, en cambio, a la actividad de las RNA polimerasas II y III (nucleoplásmicas), según los resultados de Horgen y Griffin, 1971, en *Blastocladia*; Timberlake et al., 1972 a,b, en *Achlya* e hígado de rata; y Rudic y Weisman, 1973, en *Acanthamoeba*. Ello ha llevado a Timberlake y col. a postular que la CHM tiene un efecto directo, " per se ", sobre la RNA polimerasa nucleolar. El problema, sin embargo, permanece sumamente oscuro, dado que si-

guiendo las mismas técnicas experimentales, otros autores han concluido que ni la actividad RNA polimerasa total (Summers et al., 1966, en núcleos de células HeLa; Eckert y Franke, 1975, en Tetrahymena) ni, en particular, la actividad RNA polimerasa nucleolar (Yu y Feigelson, 1972; Higashinaka-gawa y Muramatsu, 1972, en células hepáticas; Gross y Pogo, 1974, en levaduras), son, " per se ", afectadas por la droga.

Respecto a nuestros propios resultados, parece difícil admitir que la inhibición específica de la síntesis de pre-rRNA, observada por aplicación " in vivo " de CHM, pueda deberse fundamentalmente a un efecto tóxico, directo, de la droga sobre la actividad RNA polimerasa, pues habría que explicar por qué dicha toxicidad no se manifiesta cuando la CHM es aplicada directamente sobre el sistema celular aislado (i.e., " in vitro "). Esto parece más bien indicarnos que el efecto ha de ser mediado por la síntesis de proteínas. En todo caso, una investigación más a fondo de este fenómeno requeriría comparar el efecto observado con los obtenidos por inhibición " in vivo " de la síntesis de proteínas mediante otros procedimientos. Nuestros intentos de utilizar la ANS bajo estas condiciones han tropezado, hasta el momento, con ciertas dificultades metodológicas.

b.- Efecto " in vitro " de la CHM y ANS.

A la luz de lo expuesto, resulta de difícil interpretación el incremento observado en la síntesis de pre-rRNA bajo condiciones de inhibición " in vitro " de la síntesis de proteínas. Ello parece implicar la puesta en funcionamiento de distintos mecanismos de regulación, según las glándulas se encuentren en su propio entorno larvario, o bien incubadas en un medio artificial.

Existen no obstante resultados congruentes con nuestros datos , en otros organismos biológicos. Así, la síntesis de RNA ribosomal puede resultar incrementada al inhibir la síntesis de proteínas mediante una dieta deficiente (Stenram, 1958 y 1972; Bailey et al., 1976), o por aplicación de CHM y ANS en hígado de rata no regenerante (Rizzo y Webb, 1969). El fenómeno es observado más frecuentemente cuando un inhibidor de la síntesis de proteínas es aplicado en células que se encuentran previamente en bajo estado metabólico. P.e., en procariotes, por adición de cloranfenicol en cultivos bacterianos en fase estacionaria (Fraenkel y Neidhart, 1961) o creciendo en medio mínimo (Kurland y Maloe, 1962); en células eucarióticas cultivadas en un medio deficiente, por aplicación de CHM y ANS (Smulson y Thomas, 1969; Smulson, 1970, en células HeLa), o de bajas dosis de CHM (Pogo y Zbrezezna, 1978, en células de tumor ascítico).

Una ulterior especulación sobre este fenómeno, tal como aparece en nuestro sistema biológico, será ofrecida más adelante.

En suma, y como finalización de este apartado, hemos de hacer dos consideraciones:

+) El comportamiento diferencial de las distintas especies de RNA parece indicar que existen distintos mecanismos de regulación para los diferentes RNAs.

+) La activación neta que fue detectada a nivel del RNA total es el resultado de un balance cuantitativo de lo ocuriente para las diferentes especies de RNA.

2.3. En torno a un modelo de regulación de la transcripción.

La idea más comunmente admitida es que la regulación de la síntesis de RNA en organismos eucarióticos se realiza por un mecanismo de control positivo. A partir de un estado de represión inespecífico del genoma, la expresión particular de ciertos genes sería promovida por efectores capaces de producir una desrepresión en regiones específicas del genoma, haciéndolas accesibles a su lectura por las RNA polimerasas. Un modelo ya clásico dentro de esta línea es el elaborado por Britten y Davidson (1969), y Davidson y Britten (1971 y 1973). Sin embargo, evidencias experimentales obtenidas más recientemente parecen indicar que la realidad es bastante más compleja.

La finalidad que se persigue en este apartado es intentar una interpretación de nuestros resultados en un contexto teórico más amplio, buscando su posible conexión con modelos recientes tocantes a la regulación de la transcripción en organismos eucarióticos.

El fenómeno fundamental a explicar es el desacoplamiento observado entre las actividades de transcripción y síntesis de proteínas, por aplicación de inhibidores específicos. Esto nos conecta con el mecanismo de " control estricto ", y su funcionamiento en organismos eucarióticos.

2.3.1. Restricción y relajación. Modelo de Gross y Pogo.

Se ha definido el " control estricto " como un proceso ge-

néticamente controlado, observado inicialmente en organismos procarióticos, por el cual su metabolismo general se adapta a cambios de nutrientes en el medio de cultivo (Edlin y Broda, 1968). Así, una privación de aminoácidos en el medio de cultivo inhibe la síntesis de proteínas coordinadamente con otros procesos metabólicos, entre ellos la síntesis de RNA. Se habla entonces de un estado de " restricción ". En estas condiciones, la aplicación de ciertos inhibidores de la síntesis de proteínas, como el cloranfenicol, puede producir un desacoplamiento entre dichas actividades - i.e., una reactivación de la síntesis de RNA, continuando en cambio la depresión de la síntesis de proteínas -. Se habla entonces de un fenómeno de " relajación ". (Como revisión del problema de control estricto, y los mecanismos de control implicados, puede verse Goldberger et al., 1976).

Posteriormente se ha observado que el control estricto, o un sistema de regulación equivalente, parece también existir en organismos eucarióticos. Así, a lo largo de esta Discusión hemos citado resultados que mostraban que una dieta o medio de cultivo deficiente en nutrientes esenciales podía originar una inhibición coordinada en la síntesis de proteínas y RNA (i.e., equivalente a la " restricción "), y que la adición en tales condiciones de CHM o, eventualmente, ANS, podía dar lugar a una reactivación (i.e., equivalente a la " relajación ") de la síntesis de RNA (Smulson y Thomas, 1969; Smul-

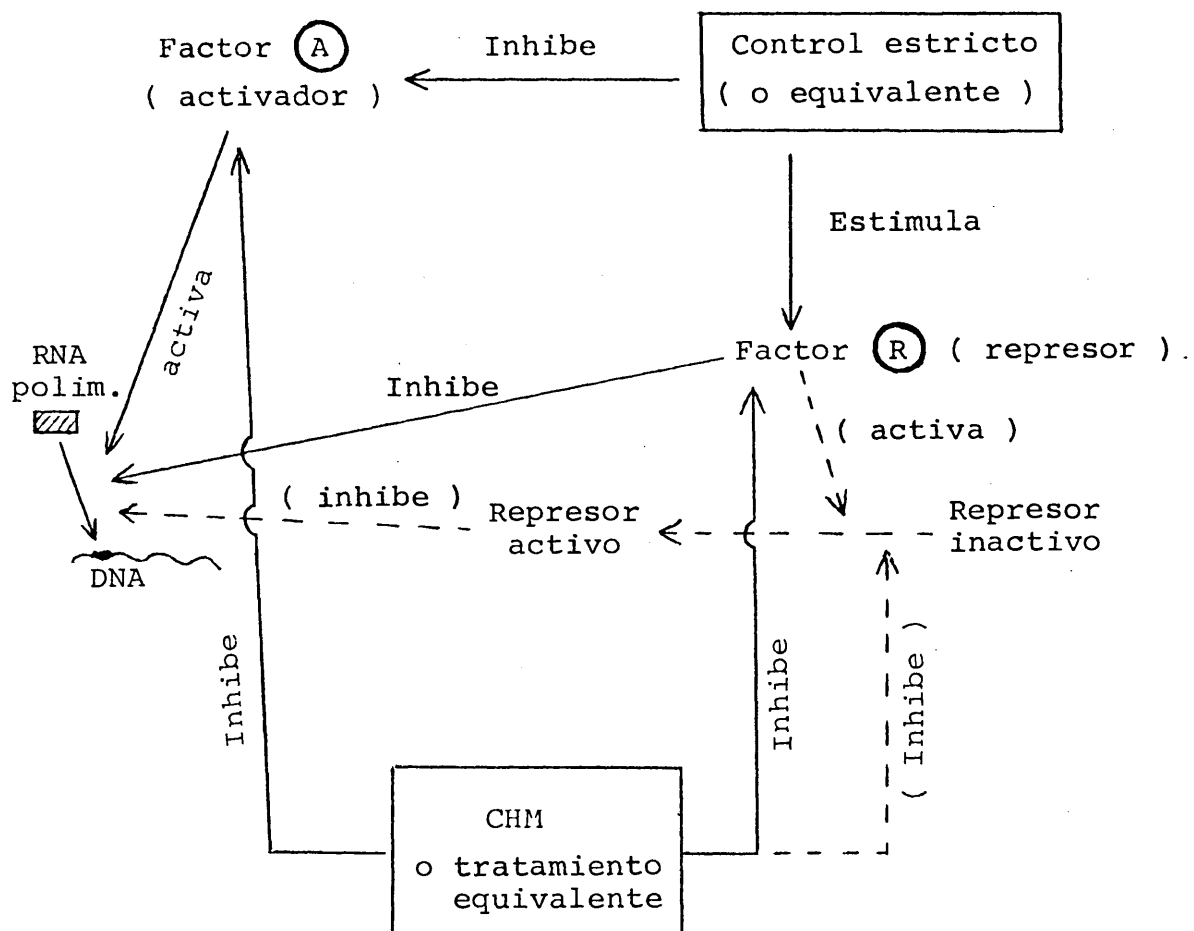
son, 1970; Hershko et al., 1971, en células de mamíferos; Foury y Goffeau, 1973; Gross y Pogo, 1974, en levaduras).

En este contexto, Gross y Pogo (1974, 1976 a,b) han concluido, tras un complejo proceso experimental, en la elaboración de un modelo de regulación de la transcripción en organismos eucarióticos que, por su interés para la interpretación de nuestros resultados, reproducimos aquí simplificadaamente (véase esquema 3). Este modelo se basa en el juego conjunto de dos factores o grupos de factores de acción antagónica sobre la actividad RNA polimerasa, presumiblemente controlando la accesibilidad al DNA. A saber:

+) Factores moduladores positivos (A), polipéptidos de vida corta, que activarían la unión RNA polimerasa - DNA.

+) Factores moduladores negativos (R), que reprimirían dicha unión, bien sea por sí mismos o bien activando la forma inactiva de un represor. Su síntesis o actividad está controlada por los genes de restricción.

La privación en la dieta de algún aminoácido esencial, u otro tratamiento equivalente, daría lugar, al ser inhibida la síntesis de proteínas, a una rápida disminución de la concentración en la célula de los factores activadores (A). Paralelamente, mediado por el funcionamiento de los genes de restricción, se induciría la síntesis o activación de los factores represores (R). Ambos efectos redundarían en la restricción de la unión RNA polimerasas - DNA, y consiguientemen-

ESQUEMA 3

te una menor síntesis de RNA .

En estas condiciones, la administración de CHM u otro inhibidor o tratamiento equivalente, podría dar lugar a una síntesis o actividad de los factores represores (R), lo que se plasmaría en una recuperación parcial de la síntesis de RNA (i.e., relajación).

Más recientemente, Pogo y Zbrezná (1978) han confirmado la aparente validez de este esquema para el caso particular de la regulación de la actividad RNA polimerasa nucleolar, en células de tumor ascítico.

2.3.2. Posibles mecanismos de control de la expresión génica en células politenizadas.

El modelo expuesto podría ilustrar en buena medida los mecanismos responsables de la regulación de la transcripción en células politenizadas.

a.- Factores implicados en la regulación.

a.1.- Factores represores.

Nuestros datos mostraban que :

+) La CHM y ANS, a dosis fuertemente inhibitorias de la síntesis de proteínas, inducen un rápido incremento en la síntesis de RNA. Esto tenía su correlato, a nivel morfológico, en la desrepresión del BR2 por efecto de las drogas.

+) Dicho incremento era debido, al menos en parte, a una mayor tasa de " iniciación " en el sistema de transcripción.

Una explicación de estos hechos podría ser ofrecida por las

siguientes hipótesis:

- En células politenizadas de *Chironomus* existe un control negativo de la transcripción.

- Es ejercido por factores moduladores negativos con especificidad local de acción.

- Provocan la restricción de la unión de las RNA polimerasas a ciertas regiones del DNA.

Algunas secuencias del DNA estarían " naturalmente " reprimidas (es decir, genes no expresados bajo condiciones ambientales normales), en tanto otras lo serían sólo por determinados tratamientos (p.e., un cambio de nutrientes). La adición de CHM o ANS lograría romper el estado de represión, al inhibir la síntesis o actividad de los factores represores.

¿Cuál podría ser la naturaleza de dichos factores ?

- +) La hipótesis más inmediata podría radicar en que se tratase de polipéptidos de muy corta vida, cuya concentración en la célula decaería rápidamente al ser inhibida la síntesis de proteínas.

- +) Otra posibilidad alternativa, que nos acercaría más a lo formulado por Gross y Pogo, sería el que las drogas actuaran inhibiendo la actividad de los factores represores, o alguna reacción responsable de su activación. Esto no exigiría su naturaleza proteica.

En este aspecto, se ha especulado con un posible papel de control llevado a cabo por nucleótidos tales como el

ppGpp o ppGppp, cuyo papel como moduladores negativos de la transcripción en procariotes parece probado (Hershko et al., 1971; Goldberger et al., 1976). Sin embargo, los resultados para probar esta posibilidad en células eucarióticas han dado, hasta el momento, resultados negativos (Smulson, 1970; Mamont et al., 1972; Buckel y Bock, 1973; Alberghina et al., 1973; Gross y Pogo, 1976b).

a.2.- Factores activadores.

+) Nuestros resultados han mostrado que la CHM, bajo condiciones de aplicación " in vivo ", deprime selectivamente la actividad RNA polimerasa nucleolar. Sin excluir un posible efecto tóxico adicional de la droga, esta depresión es normalmente atribuida a la inhibición de la síntesis de proteínas.

+) Desde un punto de vista morfológico hay que notar que, según observaciones realizadas en nuestro laboratorio, la CHM y ANS, además de posibilitar una desrepresión específica de ciertos loci, inducen el colapsamiento de otros puffs, lo que supone la represión de la expresión génica en algunos loci extranucleolares. (Villanueva, 1978).

Estos datos podrían indicar la existencia de un control positivo de la transcripción, no sólo a nivel de los genes nucleolares, sino de todo el genoma. Si dicho control es ejercido por factores proteicos de gran labilidad, la inhibición de la transcripción de ciertos genes por la CHM o la ANS po-

dría explicarse por un descenso en la célula de la concentración de dichos factores, al ser inhibida la síntesis de proteínas.

a.3.- Resumen.

Por todo ello, parece admisible la hipótesis de que la actividad de transcripción es el resultado de un equilibrio circunstancial de factores moduladores positivos y negativos. Dicho equilibrio - y, por ello, la tasa de transcripción - sería específico para cada gen o grupo particular de genes.

Esto viene apoyado por el hecho de que un mismo tratamiento - p.e., adición de hormonas, variaciones en los nutrientes del medio, en la concentración salina, alteraciones térmicas - pueda producir cambios simultáneos opuestos en la expresión de distintos puffs en el genoma (véase, p.e., Ashburner, 1970).

b.- Niveles de regulación.

Se trata ahora de saber a qué niveles puede ejercerse el control de la transcripción en células politenizadas.

Si la medida de la tasa de transcripción de un gen viene dada por el número de copias de RNA del mismo producidas por unidad de tiempo, entonces su regulación cuantitativa puede ocurrir:

+) En un primer nivel, modulando la tasa de lectura de dicho gen, en cada cromatidio, por las RNA polimerasas. Este modo de regulación es común para toda célula.

+) En un segundo nivel, variando el número de cromatidios

en los que dicho gen está siendo actualmente transcrito. Recordemos a este efecto (Introducción, 1.3.), que el número de cromómeros que participan activamente en un puff puede variar. Este modo de regulación sólo puede darse en células donde existe una multiplicidad de copias del mismo cromatidio: células poliploides y politenizadas.

2.3.3. Sobre la activación del RNA nucleolar.

Como se indicó anteriormente en esta Discusión (2.2.2.a), aunque la activación observada en la síntesis de pre-RNA por aplicación " in vitro " de CHM y ANS en glándulas salivales contradice la idea comunmente admitida sobre la inhibición preferencial del RNA nucleolar, existen resultados mostrando que la actividad RNA polimerasa nucleolar puede resultar incrementada al aplicar inhibidores de la síntesis de proteínas en células en bajo estado metabólico por carencia en el medio de cultivo de algún nutriente esencial (es decir, en estado de restricción). Se trataría, en estos casos, de un fenómeno de " relajación ".

La consideración del " control estricto " puede sugerirnos, a nivel muy especulativo, una explicación de nuestros resultados. En efecto, observaciones realizadas en nuestro laboratorio han mostrado que:

+) La simple extracción y mantenimiento " in vitro " de las glándulas salivales parece afectar de modo especial a las estructuras nucleolares, mostrando un alto número de nucleo-

los segregados , y " droplets " en su interior.

+) La tasa de captación e incorporación de uridina se ve muy disminuida por el sólo hecho de preincubar las glándulas " in vitro " durante 1 - 3 horas.

A la luz de estas observaciones podría postularse que la extracción y mantenimiento " in vitro " de las glándulas, por sí sola, tuviera un efecto de algún modo semejante al de la " restricción " genéticamente controlada, en lo referente a un incremento en la actividad de los factores represores que controlan la transcripción de los genes nucleolares. Si en estas condiciones, conforme a la hipótesis de Gross y Pogo, la CHM (y, en este caso, también la ANS) inhibieran la síntesis o actividad de dichos factores, ello podría explicar el incremento de la actividad RNA polimerasa nucleolar respecto a los controles no tratados con las drogas.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo del trabajo realizado para esta Tesis, podemos destacar las siguientes conclusiones principales:

+) Se ha elaborado un método que permite estimar satisfactoriamente la tasa de captación de uridina- H^3 , medida como radiactividad ácido-soluble, en células de glándulas salivales de *Chironomus*. Este método, que supone una innovación en este sistema biológico, podrá ser eventualmente aplicable a la estimación de la actividad de captación de otros metabolitos.

+) La tasa de captación de uridina se ve diferencialmente modificada por aplicación "in vitro" de distintos inhibidores.

+) La discrepancia observada entre el tamaño de puffing y la incorporación de uridina- H^3 en el anillo de Balbiani 2, por aplicación de un choque térmico, puede ser satisfactoriamente explicada como debida a cambios en la tasa de captación del precursor, por efecto del tratamiento.

+) La medida relativa de la actividad de transcripción, a partir de la incorporación en RNA de un precursor marcado, requiere el conocimiento de los posibles cambios en la tasa de captación de dicho precursor, que permita eventualmente la aplicación de factores correctores.

+) La inhibición de la síntesis de proteínas, por aplicación de cicloheximida y anisomicina, induce un incremento en la síntesis de RNA total glandular.

+) Dicho incremento responde, al menos en parte, a una mayor actividad de " iniciación " en el mecanismo de transcripción.

+) Existe una respuesta diferente de las distintas especies de RNA recién sintetizado a la inhibición de la síntesis de proteínas, tal que:

- Es máximamente incrementada la síntesis de RNA de bajo peso molecular (4-5S).

- En menor medida, es también incrementada la síntesis de hnRNA.

- La síntesis de RNA nucleolar es la menos afectada, y, bajo ciertas condiciones, selectivamente deprimida.

+) Todos estos datos, junto con otras evidencias morfológicas aducidas, sugieren la existencia de distintos mecanismos de regulación de la transcripción en células politenizadas, dotados de alta especificidad local de acción.

B I B L I O G R A F I A

- Aaronson, S.A., Anderson, G.R., Dunn, C.Y., and Robbins, K.C. Induction of Type-C RNA virus by Cycloheximide: Increased expression of virus-specific RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,3941-3945 (1974).
- Alberghina, F.A.M., Schiafonati, L., Zardi, L., and Sturani, E. Lack of guanosine tetraphosphate accumulation during inhibition of RNA synthesis in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 312,435-439 (1973).
- Alonso, P., and Perez-Silva, J. Giant chromosomes in protozoa. Nature, Lond. 205,313-314 (1965).
- Aller, P., Fernandez-Gomez, M.E., and Diez, J.L. RNA synthesis in root meristems of Allium cepa L. bulbs: 1. Sonication as a method to eliminate contaminating bacteria. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 89,29-40 (1978).
- Ammermann, D. Cytologische und genetische unlersuchungen an dem ciliaten Stylonychia mytilus eherenberg. Arch. Protistenk. 108,109-152 (1965).
- Ashburner, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Advan. in Insect Physiol. 7,1-95 (1970).
- Ashburner, M. Puffing patterns in Drosophila melanogaster and related species. In: Results and problems in cell differentiation. (W. Beermann, ed.) Vol 4, pp.101-151. Springer-Verlag, Berlin and New York. (1972a)

- Ashburner, M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VI. Induction by ec-dysone in salivary glands of *Drosophila melanogaster* cultured in vitro. *Chromosoma* 38, 255-281 (1972b).
- Bailey, R.P., Vrooman, M.J., Sawai, Y., Tsukada, K., Short, J., and Lieberman, I. Aminoacids and control of nucleolar size, the activity of RNA polymerase I and DNA synthesis in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 3201-3205 (1976).
- Bajaj, Y.P.S., Rathore, V.S., Wittwer, S.H., and Adams, M.V. Effect of Dimethylsulfoxide on zinc⁶⁵ uptake, respiration, and RNA and protein metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris*) tissues. *Am. J. Bot.* 57, 794-799 (1970).
- Balbani, E.G. Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. *Zool. Anz.* IV, 637-641 y 662-666 (1881).
- Beermann, W. Chromomerenkonstanz und spezifische modifikation der chromosomenstruktur in der entwicklung und organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5, 139-198 (1952).
- Beermann, W. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 21, 217-232 (1965).
- Beermann, W. Riesenchromosomen. In. *Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung.* (L.V. Heilbronn and

- F. Weber eds) Vol VI, part D, pp 1-161. Springer-Verlag Berlin and New York (1962).
- Beermann, W. Control of differentiation at the chromosomal level. J. Exp. Zool. 157,49-62 (1964).
- Beermann, W. Gene action at the level of the chromosome. In: " Heritage from Mendel ". (A. Brink, ed.) pp. 179-201. Univ. of Wisconsin Press, Madison (1967).
- Beermann, W. Effect of α -amanitine on puffing and intranuclear RNA synthesis in Chironomus salivary glands. Chromosoma 34,152-167 (1971).
- Beermann, W. Chromomeres and genes. In: " Results and problems in cell differentiation " (W. Beermann, ed.) vol.4, pp. 1-33. Springer-Verlag, Berlin and New York (1972).
- Benecke, B.J., Ferencz, A., Seifart, K.H. Resistance of hepatic RNA polymerases to compounds effecting RNA and protein synthesis in vivo. FEBS Lett. 31,53-58 (1973).
- Bennet, L.L.(Jr.), Smithers, D., Ward, C.T. Inhibition of DNA synthesis in mammalian cells by actidione. Biochim. Biophys. Acta 87,60-69 (1964).
- Berendes, H.D. The control of puffing in Drosophila hydei. In: " Results and problems in cell differentiation " (W. Beermann, ed.) vol.4, pp.181-207. Springer-Verlag, Berlin and New York (1972).
- Birch, B., Turnock, G. The uptake and metabolism of uridine by the slime mould Physarum polycephalum. Eur.J.Biochem. 69, 257-263 (1976).

- Bölcsfoldi, G. A correlation between the polysome pattern and the synthesis of transfer RNA in Chang's liver cells. *Exp. Cell Res.* 88,231-240 (1974).
- Bostock, C.J., and Sumner, A.T. In: The eukaryotic chromosome. pp. 232-268. Elsevier/North Holland Biochemical Press. Amsterdam, The Netherlands (1978).
- Britten, R.J., and Davidson, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165,349-357 (1969).
- Buckel, P., and Bock, A. Lack of accumulation of unusual guanosine nucleotides upon aminoacid starvation of two eukaryotic organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 324,184-187 (1973).
- Case, S.T., and Daneholt, B. The size of transcriptional unit in Balbiani rings of Chironomus tentans as derived from analysis of the primary transcript and 75S RNA. *J. Mol. Biol.* 124,223-241 (1978).
- Cassagneau, P. Les chromosomes salivaires polytenes chez Bilobela grassei (Collemboles:Neauridae). *Chromosoma* 35,57-83 (1971).
- Cereghini, S., and Franze-Fernández, H.T. Erlich ascites cells DNA-dependent RNA polymerases: effect of aminoacids and protein synthesis inhibition. *FEBS Letters* 41,161-165 (1974).
- Clever, U. Control of chromosome puffing. In: The control of nuclear activity. (L. Goldstein, ed). Englewood Cliffs:Prentice Hall (1967).
- Clever, U., Storbeck, I., Romball, C.G. Chromosome activity and

- cell function in polytenic cells.I. Protein synthesis at various stages of larval development. *Expl. Cell Res.* 55, 306-316 (1969).
- Comings, D.E. Incorporation of ^3H -5-uridine into RNA. *Exp. Cell Res.* 41,677-681 (1966).
- Craig, N.C., and Perry, R.P. Aberrant intranucleolar maturation of ribosomal precursors in the absence of protein synthesis. *J. Cell Biol.* 45,554-564 (1970).
- Chan, V.L., Whitmore, G.F., and Siminovitch, L. Mammalian cells with altered forms of RNA polymerase II. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69,3119-3123 (1972).
- Chesterton, C.J., Coupar, B.E.H., Butherworth, P.H.W., Buss, J., and Green, M. Studies on the control of ribosomal RNA synthesis in HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* 57,79-83 (1975).
- Daneholt, B. Base ratios in RNA molecules of different sizes from Balbiani rings. *J. Mol. Biol.* 49,381-391 (1970).
- Daneholt, B. Giant RNA transcript in a Balbiani ring. *Nature New Biol.* (London) 240,229-232 (1972).
- Daneholt, B. Transfer of genetic information in polytene cells. *Inter. Rev. Cytol.* 4,417-462 (1974).
- Daneholt, B. Transcription in polytene chromosomes. *Cell* 4,1-9 (1975).
- Daneholt, B., and Edström, J.E. The content of deoxiribonucleic acid in individual polytene chromosomes of Chironomus tentans. *Cytogenetics* 6,350-356 (1967).

- Daneholt, B., and Hosick, H. Evidence for transport of 75S RNA from a discrete chromosome region via nucleolar sap to cytoplasm in Chironomus tentans. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 442-446 (1973).
- Daneholt, B., Edström, J.E., Egyházi, E., Lambert, B., and Ringborg, U. Chromosomal RNA synthesis in polytene chromosomes of Chironomus tentans. Chromosoma 28,399-417 (1969).
- Daneholt, B., Edström, J.E., Egyházi, E., Lambert, B., and Ringborg, U. RNA synthesis in a Balbiani ring in Chironomus tentans salivary gland cells. Chromosoma 28,418-429 (1969).
- Davidson, E.H., and Britten, R.J. Note on the control of gene expression during development. J. Theor. Biol. 32,123-130 (1971).
- Davidson, E.H., and Britten, R.J. Organization, transcription and regulation in the animal genome. Quant. Rev. Biol. 48,565-613 (1973).
- Delmer, D.P., and Mills, S.E. A technique for the assay of enzymes in intact plant cells in the presence of dimethylsulfoxide. Plant Physiol 44, 153-155 (1971).
- Delseny, M., Aspart, L., and Guitton, Y. Effect of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on RNA synthesis in radish seedlings. Biochimie 59,51-57 (1977).
- Díez, J.L. Effect of Cordycepin (3'-desoxyadenosine) on polytene chromosomes of Chironomus pallidivittatus salivary glands.

Chromosoma (Berl.) 42,345-348 (1973).

Díez, J.L., and Stockert, J.C. Formation of ribonucleoprotein " droplets " in Chironomus salivary gland nuclei. J. Cell Biol. 7, 371a (1976)

Díez, J.L., Santa-Cruz, M.C., Villanueva, A., Aller, P. Dependence of the Balbiani rings puffing state on the protein synthesis. Chromosoma (en prensa).

Eckert, W.A., Franke, W.W. Changes in the fine structure and composition of macronuclei of Tetrahymena pyriformis induced by drugs interfering with RNA synthesis and processing. Cytobiologie 11,392-418 (1975).

Edlin, G., Broda, P. Physiology and genetics of the "ribonucleic acid control locus" in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 32,206-226 (1968).

Edström, J.E., Daneholt, B. Sedimentation properties of the newly synthesised RNA from isolated nuclear components of Chironomus tentans salivary gland cells. J. Mol. Biol. 28,331-343 (1967).

Edström, J.E., Tanguay, R. Cytoplasmic ribonucleic acids with messenger characteristics in salivary gland cells of Chironomus tentans. J. Mol. Biol. 84,569-583 (1974).

Edström, J.E., Egyhazi, E., Daneholt, B., Ringborg, U. Localization of newly synthesized low molecular weight RNA in polytene chromosomes from Chironomus tentans. Chromosoma 35,431-442 (1971).

- Egyházi, E., Daneholt, B., Edström, J.E., Lambert, B., Ringborg, U. Low molecular weight RNA in cell components of Chironomus tentans salivary glands. J. Mol. Biol. 44,517-532 (1969).
- Egyházi, E., Daneholt, B., Edström, J.E., Lambert, B., Ringborg, U. Intracellular distribution of low molecular weight RNA in Chironomus tentans. J. Cell Biol. 48,120-127 (1971).
- Ellgaard, E.G., Clever, U. RNA metabolism during puff induction in Drosophila melanogaster. Chromosoma 36,60-78 (1971).
- Fakan, S. Inhibition of nucleolar RNA synthesis by cycloheximide as studied by high resolution radioautography. J. Ultras. Res. 34,586-596 (1971).
- Farber, J.L., Farmer, R. Differential effects of cycloheximide on protein and RNA synthesis as a function of dose. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51,626-630 (1973).
- Fiala, E.S., Davis, F.F. Preferential inhibition of synthesis and methylation of ribosomal RNA in Neurospora crassa by Actidione. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18,115-118 (1965).
- Foury, F., Goffeau, A. Stimulation of yeast RNA synthesis by cycloheximide and 3',5'-Cyclic AMP. Nature New Biol. 245, 44-47 (1973).
- Fraenkel, D.G., Neidhart, F.C. Use of chloranfenicol to study control of RNA synthesis in bacteria. Biochim. Biophys. Acta 53,96-110 (1961).

- Franze-Fernandez, M.T., Fontanive-Sangüesa, A.V. Effects of amino-acids on the α -amanitin-insensitive RNA polymerase activity in the isolated nuclei of Ehrlich ascites cells. *Biochim. Biophys. Acta* 331,71-80 (1973).
- Franze-Fernández, M.T., Fontanive-Sangüesa, A.V. Control of r-RNA synthesis: effects of protein synthesis inhibition. *FEBS letters* 54,26-29 (1975).
- Fukuhara, H. RNA synthesis of yeast in the presence of cycloheximide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18,297-301 (1965).
- Grenson, M., Crabeel, M., Wiame, J.M., Bechet, J. Inhibition of protein synthesis and stimulation of permease turnover in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30,414-419 (1968).
- Goldberg, R.F., Deeley, R.G., Mullinix, K.P. Regulation of gene expression in prokaryotic organisms. In: *Advances in genetics* vol. 18. (E.W. Caspari ed.) Academic Press, New York, San Francisco USA. pp. 1-67 (1976).
- Grollman, A.R. Inhibitors of protein biosynthesis.II. Mode of action of anisomycin. *J. Biol. Chem.* 242,3223-3226 (1967).
- Gross, K.J., Pogo, A.O. Control mechanism of ribonucleic acid synthesis in eukaryotes. The effect of aminoacid and glucose starvation and cycloheximide on yeast DNA-dependent ribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* 249,568-576 (1974).

- Gross, K.J., Pogo, A.O. Control of ribonucleic acid synthesis in eukaryotes. 2. The effect of protein synthesis on the activities of nuclear and total DNA-dependent RNA polymerases in yeast. *Biochemistry* 15,2070-2081 (1976a).
- Gross, K.J., Pogo, A.O. Control of ribonucleic acid synthesis in eukaryotes. 3. The effect of cycloheximide and edeine on RNA synthesis in yeast. *Biochemistry* 15,2082-2086 (1976b).
- Gross-Bellard, M., Oudet, P., Chambon, P. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 36,32-38 (1973).
- Grummt, I., Smith, V.A., Grummt, F. Aminoacid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* 7,439-445 (1976).
- Grummt, I., Grummt, F. Control of nucleolar RNA synthesis by the intracellular pool sizes of ATP and GTP. *Cell* 7,447-453 (1976).
- Hastings, J.R.B., Kirby, K.S. The nucleic acids of Drosophila melanogaster. *Biochem. J.* 100,532-539 (1966).
- Heitz, E., Bauer, H. Beweise für die chromosomennatur der kernschleifen in den kernen von Bibio hortulanus L. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 17,67-82 (1933).
- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R., Tomkins, G.M. Pleiotypic response. *Nature New Biol.* 232,206-211 (1971).
- Higashi, K., Matsukisa, T., Kitao, A., Sakamoto, Y. Selective suppression of nucleolar RNA metabolism in the absence of

- protein synthesis. Biochem. Biophys. Acta 166,388-393 (1968).
- Higashinakagawa, T., Muramatsu, M. In vitro effect of cycloheximide on the nucleolar and extranucleolar nuclear RNA polymerase of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47,1-6 (1972).
- Horgen, P.A., Griffin, D.H. Specific inhibitors of the three RNA polymerases from the aquatic fungus Blastocladiella emersonii. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68,338-341 (1971).
- Hunter, D.R., Norberg, C.L., Segel, I.H. Effect of cycloheximide on L-leucine transport by Penicillium chrysogenum: Involvement of calcium. J. Bacteriol. 114,956-960 (1973).
- Jacquez, J.A. Transport and enzymatic splitting of pyrimidine nucleoside in Ehrlich cells. Biochim. Biophys. Acta 61,265-277 (1962).
- Jacob, S.T., Sajdel, E.M., Munro, H.N. Specific action of α -amanitin on mammalian RNA polymerase protein. Nature 225,60-62 (1970).
- Jimenez, A. Inhibitors of translation. TIBS 1,28-30 (1976).
- Kedinger, C., Gniazdowski, M., Mandel, J.L., Gissinger, F., Chambon, P. α -amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38,165-171 (1970).
- Kerridge, D. The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acids and protein synthesis in Saccharomyces carlsbergensis. J. Gen. Microbiol. 19,497-506 (1958).

- Key, J.L. Plant Physiol. 41, 1257-1264 (1966)
- Keyl, H.G. , Pelling, C. Differentielle DNS-replikation in den speicheldrüsen-chromosomen von Chironomus thummi. Chromosoma 14, 347-359 (1963).
- King, R.L. , Beams, H.W. Somatic synapsis in Chironomus. J. Morphol. 56, 577-591 (1933).
- Kirk, J.M. The mode of action of Actinomycin D. Biochim. Biophys. Acta 42, 167-169 (1960).
- De Kloet, S.R. Ribonucleic acid synthesis in yeast. The effect of cycloheximide on the synthesis of ribonucleic acid in Saccharomyces carlsbergensis. Biochem J. 99, 566-581 (1966).
- Kloetzel, J.A. , Laufer, H. A fine structural analysis of larval salivary glands function in Chironomus thummi (Diptera). J. Ultrastruct. Res. 29, 15-36 (1969).
- Kurland, C.G. , Maloe, O. Regulation of ribosomal and transfer RNA synthesis. J. Mol. Biol. 4, 193-210 (1962).
- Lambert, B. The chromosomal distribution of Balbiani ring DNA in Chironomus tentans. Chromosoma 50, 193-200 (1975).
- Lambert, B., Wieslander, L., Daneholt, B., Egyházi, E. , Ringborg, In situ demonstration of DNA hybridizing with chromosomal and nuclear sap RNA in Chironomus tentans. J. Cell Biol. 53, 407-418 (1972).
- Lambert, B. , Daneholt, B. Microanalysis of RNA from defined cellular components. In. "Methods in Cell Biology" (D.M. Prescott, ed.) Vol. X, pp. 17-47. Academic Press, New York-San Francisco-London (1975).

- Lampert, A. , Feigelson , P. A short lived polypeptide component of one of two discrete functional pools of hepatic nuclear α -amanitin resistant RNA polymerases. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 58, 1030-1038 (1974).
- Löön, U. , Edström, J.E. Proteic synthesis inhibitors and export of ribosomal subunits. *Biochem. Biophys. Acta* 475, 677-679 (1977).
- Mamont, P., Herskho, A., Karm, R., Schacter, L., Lust, L. , Tomkins, G. The pleiotypic response in mammalian cells:search for an intracellular mediator. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 48, 1378-1384 (1972).
- Mandel, P. , Quirin-Stricker, C. Effect of protein deprivation on soluble and "aggregate" RNA polymerase in rat liver. *Life Sci.* 6, 1299-1303 (1967).
- Maul, G.C. , Hamilton, T.H. The intranucleolar localization of two DNA-dependent RNA polymerase activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1371-1378 (1967).
- Moore, G.P.M. DNA-dependent RNA synthesis in fixed cells during spermatogenesis in mouse. *Exptl. Cell Res.* 68, 462-465 (1971)
- Moore, G.P.M. RNA synthesis in fixed cells by endogenous RNA polymerases. *Exptl. Cell Res.* 111, 317-326 (1978).
- Moore, G.P.M. , Ringertz, N.R. Localization of DNA-dependent RNA polymerase activities in fixed human fibroblasts by autoradiography. *Exptl. Cell Res.* 76, 223-228 (1973).
- Muramatsu, M., Shimada, N. , Higashinakagawa, T. Effect of ciclo

- heximide on the nucleolar RNA synthesis in rat liver. J. Mol. Biol. 53, 91-106 (1970).
- Nagl, W. Banded polytene chromosomes in the legume Phaseolus vulgaris. Nature, Lond. 221, 70-71 (1969).
- Nagl, W. Puffing of polytene chromosomes in a plant (Phaseolus vulgaris). Naturwissenschaften 56, 221-222 (1969).
- Nakata, Y., Bader, J.P. The uptake of nucleosides by cells in culture. II. Inhibition by 2-mercapto-1-(β -pyridethyl)benzimidazole. Biochim. Biophys. Acta 190, 1100-1101 (1969).
- Novello, F., Fiume, L., Stirpe, F. Inhibition by α -amanitin of ribonucleic acid polymerase solubilized from rat liver nuclei. Biochem. J. 116, 177-180 (1970).
- Onishi, T., Matsui, T., Muramatsu, M. Effect of cycloheximide on the nucleolar RNA synthesis in rat liver. Changes in RNA polymerase I and nucleolar template activity. J. Biochem. 82, 1109-1119 (1977).
- Painter, T.S. A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. Science, N.Y., 78, 585-586 (1933).
- Pelling, C. Ribonucleinsäure-synthese der riesenchromosomen. Autoradiographische untersuchungen and Chironomus tentans. Chromosoma 15, 71-122 (1964).
- Pelling, C. Puff RNA in polytene chromosomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 521-531 (1970).

- Perry, R.P., Kelley, D.E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin-D : Characteristic dose response of different RNA species. J. Cell Physiol. 76, 127-140 (1970).
- Plagemann, P.G.W. Effect of temperature on the transport of nucleosides into Novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture. Arch. Biochem. Biophys. 140, 223-227 (1970).
- Plagemann, P.G.W. Nucleoside transport by Novikoff rat hepatoma cells growing in suspension culture. Specificity and mechanisms of transport reactions and relationship to nucleoside incorporation into nucleic acids. Biochim. Biophys. Acta 233, 688-701 (1971).
- Plagemann, P.G.W. Permeation as the rate-limiting steps in the phosphorylation of uridine and choline and their incorporation into macromolecules by Novikoff hepatoma cells. Competitive inhibition of phenethyl alcohol, persantin and adenosine. Biochem. 8, 4782-4789 (1969).
- Plaut, W. On the replicative organization of DNA in the polytene chromosome of Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol. 7, 632-635 (1963).
- Pogo, A.O. Modification of ribonucleic acid synthesis in isolated rat liver nuclei by low salt concentrations and specific divalent cations. Biochim. Biophys. Acta 182, 57-65 (1969).

- Pogo, A.O., Zbrzezna, V.G. Cycloheximide stimulates ribosomal RNA transcription in aminoacid-starved ascites tumor cells. FEBS Letters 88, 135-138 (1978).
- Pogo, A.O., Allfrey, V.G., Mirsky, A.E. Evidence for increased DNA template activity in regenerating liver nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 550-557 (1966).
- Prabhoo, N.R. A note on the giant chromosomes in the salivary glands of Womersleya sp. (Collembola: Insecta). Bull. Ent. Madras, 2, 21-22 (1961).
- Quirin-Stricker, C., Mandel, P. Etude du renouvellement du RNA des polysomes, du RNA de transfert et du RNA "messenger" dans le foie de rat soumis a un jeûne protéique. Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 31-45 (1968).
- Reich, E., Goldberg, I.H. Actinomycin and nucleic acid function. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 3, 183-234 (1964).
- Ringborg, U., Rydlander, L. Nucleolar derived ribonucleic acid in chromosomes, nuclear sap, and cytoplasm of Chironomus tentans salivary gland cells. J. Mol. Biol., 51, 355-368 (1971).
- Ringborg, U., Daneholt, B., Edström, J.E., Egyházi, E., Rydlander, L. Evidence for transport of preribosomal RNA from the nucleolus to the chromosomes in Chironomus tentans salivary glands. J. Mol. Biol., 51, 679-686 (1970).
- Ritossa, F.M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of Drosophila. Exp. Cell Res. 35, 601-607 (1964).

- Rizzo, A.J., Webb, T.L.E. Ribosome formation in rat liver: evidence for posttranscriptional control. *Biochim. Biophys. Acta* 195, 109-122 (1969).
- Robert, M. Einfluss von Ionenstärke und pH auf die differentielle Dekondensation der Nucleoproteide isolierter Speicheldrüsen Zellkerne und Chromosomen von Chironomus thumi. *Chromosoma* 36, 1-33 (1971).
- Ro-Choi, Tae Suk, Kishan Raj, N. Babu, Pike, Lee M., Busch, H. Effects of α -amanitine, cycloheximide, and thioacetamide on low molecular weight nuclear RNA. *Biochem.*, 15, 3823-3828 (1976).
- Ross, C. Influence of cycloheximide (actidione) upon pyrimidine nucleotide metabolism and RNA synthesis in cocklebur leaf discs. *Biochim. Biophys. Acta* 166, 40-47 (1968)
- Royal, A., Simard, R. Ribosomal RNA synthesis and processing in absence of protein synthesis in CHO-tsh₁ cells. *J. Cell Biol.*, 70, 300 (a) (1976).
- Rudick, V.L., Weisman, R.A. DNA-dependent RNA polymerase from Trophozoites and Cysts of Acanthamoeba castellanii. *Biochim. Biophys. Acta* 299, 91-102 (1973)
- Ryan, A.M. Borek, E. The relaxed control phenomenon. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 11, 193-228 (1971).
- Santa-Cruz, M.C. Tesis Doctoral en preparacion
- Santa-Cruz, M.C., Villanueva, A., Diez, J.L. Effect of galactose treatment in the puffing pattern of Chironomus thummi

- Balbiani rings. Chromosoma 69, 93-100 (1978).
- Sass, H. Untersuchungen zur struktur und funktion der Balbiani-ringe von Chironomus tentans. Tesis Doctoral. Universidad de Tübingen (1978).
- Schmid, W.S., Sekeris, C.E. Possible involvement of nuclear DNA-like RNA in the control of ribosomal RNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta 312, 549-554 (1973).
- Schoon, H., Rensing, L. The effects of protein synthesis inhibiting antibiotics on the puffing pattern of Drosophila salivary glands chromosomes in vitro. Cell Different. 2, 97-106 (1973).
- Sehgal, P.B., Tamm, I., Vilcek, J. Human interferon production: superinduction by DRB. Science 190, 282-284 (1975).
- Sehgal, P.B., Darnell, J.E.(Jr), Tamm, I. The inhibition by DRB (5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) of hn RNA and m-RNA production in HeLa cells. Cell 9, 473-480 (1976).
- Seifart, K.H. In: "RNA polymerase and transcription", (L. Silvestri, ed.). North Holland, Amsterdam, 1970, p. 223.
- Seifart, K.H., Sekeris, C.E. α -amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA polymerase. Z. Naturforsch 24, 1538-1544 (1969).
- Serfling, E., Panitz, R., Wobus, V. Die experimentelle beeinflussung des puffmusters von riesenchromosomen. I. Puffinduktion durch Oxytetracyclin bei Chironomus thummi. Chromosoma 28, 107-119 (1969).

- Serfling, E., Wobus, U., Panitz, R. Effect of α -amanitin on chromosomal and nucleolar RNA synthesis in Chironomus thummi. polytene chromosomes. FEBS Letters 20, 148-152 (1972).
- Serfling, E., Maximousky, L.F., Wobus, U. Synthesis and processing of ribosomal ribonucleic acid in salivary glands of Chironomus thummi. Eur. J. Biochem. 45, 277-289 (1974).
- Siegel, M.R., Sisler, H.D. Sites of action of cycloheximide in cells of Saccharomyces pastorianus. I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism. Biochim. Biophys. Acta 87, 70-82 (1964).
- Smulson, M.E. Aminoacid deprivation of human cells: effects on RNA synthesis, RNA polymerase and ribonucleoside phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 199, 537-541 (1970).
- Smulson, M.E., Thomas, J. Ribonucleic acid synthesis of human cells during aminoacid deprivation. J. Biol. Chem. 244, 5309-5312 (1969).
- Sobin, B.A., Tanner, F.W. J. Amer. Chem. Soc. 76, 4053 (1954).
- Spotts, Ch.R., Stanier, R.Y. Mechanism of Streptomycin action on bacteria: a unitary hypothesis. Nature 192, 633-637 (1961).
- Stambrook, P.J., Siskin, J.E., Ebert, J.D. Uridine uptake and its intracellular phosphorylation during the cell cycle. J. Cell Physiol. 82, 267-276 (1973).
- Steinemann, M. Theorien zur gelektrophorese und ihre anwendung an ein agarose-langsamen-gel-system. Memoria de Licenciatura (1971).

- Stenram, U. Interferometric determinations of the ribose nucleic acid concentration in liver nucleoli of protein-fed and protein-deprived rats. *Exp. Cell Res.* 15, 174-183 (1958).
- Stenram, U. Relationship between nucleolar size and the synthesis and processing of pre-ribosomal RNA in the rat liver. *FEBS Symp.* 24, 131-141 (1972).
- Summers, W.P., Noteboom, W.D., Mueller, G.C. A regulatory role of protein synthesis on the activity of RNA polymerase of HeLa nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22, 399-405 (1966).
- Swift, H. Nucleic acids and cell morphology in dipteran salivary glands. In: *Molecular control of gene activity.* (J.M. Allend, ed.) McGraw Hills, New York, 1962, p.73.
- Tamm, I., Hand, R., Caliguiri, L.A. Action of Dichlorobenzimidazole riboside on RNA synthesis in L-929 and HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 69, 229-240 (1976).
- Timberlake, W.E., Griffin, D.H. Differential effects of analogs of cycloheximide on protein and RNA synthesis in Achyla. *Biochim. Biophys. Acta* 349, 39-46 (1974a)
- Timberlake, W.E., Griffin, D.H. Differential effects of cycloheximide and other inhibitors of protein synthesis on "in vivo" ribosomal RNA synthesis in Achyla bisexualis. *Biochim. Biophys. Acta* 353, 248-252 (1974b).
- Timberlake, W.E., McDowell, L., Griffin, D.H. Cycloheximide

- inhibition of the DNA-dependent RNA polymerase I of Achyla bisexualis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 942 (1972a).
- Timberlake, W.E., Hagen, G., Griffin, D.H. Rat liver DNA-dependent RNA polymerase I is inhibited by cycloheximide. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 823-827 (1972b).
- Vadillo, E. Actividad de la RNA polymerasa endógena en glándulas salivales de Chironomus. Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense. Madrid (1978).
- Vázquez, D. Inhibitors of protein synthesis. FEBS Letters 40, 63-84 (1974).
- Venkatesan, N. Mechanism of inhibition of DNA synthesis by cycloheximide in Balb/3T3 cells. Biochim. Biophys. Acta 478, 437-453 (1977).
- Verbin, R.S., Goldblatt, P.J., Farber, E. The biochemical pathology of inhibition of protein synthesis in vivo. The effects of CHM on hepatic parenchymal cells ultrastructure. Lab. Invest., 20, 529-536 (1969).
- Viau, J.P., Davis, F.F. Effect of cycloheximide on the synthesis and modification of ribosomal RNA in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 209, 190-195 (1970).
- Villanueva, A. Estudios sobre la conducta de puffing de los anillos de Balbiani en Chironomus thummi. Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense. Madrid 1978.
- Wannemacher, R.W., Wannemacher, C.F. Yatvin, M.B. Aminoacid regulation of synthesis of ribonucleic acid and protein

- in the liver of rats. Biochem. J. 124, 385-392 (1971).
- Weber, M.J., Rubin, H. Uridine transport and RNA synthesis in growing and in density-inhibited animal cells. J. Cell Physiol., 77, 157-168 (1971).
- Westerberg, U.B., Bolcsfoldi, G., Eliasson, E. Control of transfer RNA synthesis in the presence of inhibitors of RNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta 447, 203-213 (1976).
- Widnell, C.G., Tata, J.R. Evidence for two DNA-dependent RNA polymerase activities in isolated rat-liver nuclei. Biochim. Biophys. Acta 87, 531-533 (1964).
- Wieslander, L, Lambert, B., Egyházi, E. Localization of 5S RNA genes in Chironomus tentans. Chromosoma 51, 49-56 (1975).
- Wiley, W.R., Matchett. Tryptophan transport in Neurospora crassa. II. Metabolic control. J. Bacteriol., 95, 959-966 (1968).
- Willems, M., Penman, M., Penman, S. The regulation of RNA synthesis and processing in the nucleolus during inhibition of protein synthesis. J. Cell Biol., 41, 177-187 (1969).
- Whiffen, A.J., Bohonas, J.N., Emerson, R.L. J. Bacteriol. 52, 610 (1946).
- Wobus, U., Panitz, R., Serfling, E. α -amanitine: its effects on RNA synthesis in polytene chromosomes. Experientia 27, 1202-1203 (1971).
- Yamamoto, H. Puffing changes and droplet formation in the balbiani rings of Chironomus tentans by hipertermic shock. Proc. 7th Inter. Congr. Electronmicroscopy. Grenoble.

255-256. Paris. Société Française de Microscopie Electronique. 1970.

Yamamoto, H. Heat-shock induced puffing. Changes in Balbiani rings. Chromosoma 32, 171-190 (1970).

Yu, F.L, Feigelson, P. The rapid turnover of RNA polymerase of rat liver nucleolus and its messenger RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 69, 2833-2837 (1972).